



Colgajo prefabricado en rata como vehículo de implantación de células madre en ingeniería tisular

Fernando Fernández Gómez

Tesis doctoral UDC / 2017

Directora: M^a Carmen Arufe Gonda

Programa de Doctorado de Ciencias de la Salud (R.D. 1393/2007)



UNIVERSIDADE DA CORUÑA



**Complexo Hospitalario Universitario
A Coruña**



Dra. M^a del Carmen Arufe Gonda, PDI no Dpto. de Medicina da Facultade de Ciencias da Saúde da Universidade da Coruña.

CERTIFICA:

Que a presente memoria de tese titulada: “Colgallo prefabricado en rata como vehículo de implantación de células nai en enxeñería tisular” presentada por Dr. Fernando Fernández Gómez para optar o grado de Doutor, foi realizada baixo a miña dirección no Dpto. de Medicina da Facultade de Ciencias de Saúde da Universidade da Coruña e cumpre tódolos requisitos de orixinalidade e rigor científico necesarios para a súa defensa.

Asdo. M^a del Carmen Arufe Gonda

En A Coruña, 5 de abril de 2017

A mi familia

Agradecimientos

Esta tesis es el resultado de la colaboración entre el Departamento de Medicina de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad de A Coruña, el Servicio de Cirugía Plástica y Quemados del Hospital Universitario de A Coruña y el Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña (INIBIC).

En primer lugar quiero agradecer a mi directora de tesis, la Dra. María Arufe Gonda por toda la ayuda y estímulo recibido durante el desarrollo de este proyecto. Por compartir de forma generosa su conocimiento y por su paciencia. Por ser un ejemplo de profesionalidad y un espejo en el que cualquier persona que se dedique a la investigación y a la docencia debe mirarse.

A Andrés Rodríguez Lorenzo por darme la idea de este trabajo y por todo su apoyo en las fases iniciales de la investigación.

Quisiera mostrar mi gratitud a todo el personal del INIBIC por su ayuda, disposición y amabilidad mostrada todo este tiempo. Los veterinarios Alberto Centeno y Eduardo López, las técnicas de anatomía patológica Purificación Filgueira y Noa Goyanes, la técnico especialista de laboratorio Soledad Blanco. A Jesús Mateos, Pablo Fernández y Juan Fafián por su generosidad y ser buenos compañeros.

A mi primo Carlos Valiño por su ayuda con la parte informática.

Finalmente quisiera agradecer de manera especial a mis padres por regalarme lo más valioso que un hijo puede heredar, la educación. Por tantos años de dedicación, estímulo y de brindarme las mejores oportunidades de formación. A Ángela por ser tan buena hermana y estar siempre ahí. A mi otra mitad, mi mujer Belén, por su ánimo, su apoyo incondicional, por comprender las horas de ausencia y por su ayuda en la toma de decisiones. A Tiziana, el motor de mi vida, la que hace que todo el esfuerzo valga la pena.

Resumen

Colgajo prefabricado en rata como vehículo de implantación de células madre en ingeniería tisular.

Objetivos: El propósito de este estudio es la creación de un modelo experimental en rata de un colgajo prefabricado como vehículo de implantación de células madre mesenquimales (CMMs), determinar si la prefabricación y el tiempo influyen en la implantación y supervivencia de las CMMs y por último observar si existe migración celular a distancia.

Materiales y métodos: Se aislaron CMMs derivadas de cordón umbilical y se inyectaron en un colgajo epigástrico en rata aislado de la vecindad. Los animales fueron divididos aleatoriamente en 4 grupos en función del momento del sacrificio. Posteriormente se realizaron estudios histológicos e inmunohistoquímicos.

Resultados: Hay diferencias significativas en el recuento de CMMs en función del órgano estudiado. Nuestros datos sugieren que la variable tiempo puede influir en el hallazgo de CMMs. Se encuentran CMMs a distancia del órgano inyectado, con preferencia por el pulmón.

Conclusiones: Este modelo se confirma como una opción reproducible en el campo de la ingeniería tisular. La prefabricación del colgajo influye en la implantación de las CMMs. Son necesarios más estudios que analicen la influencia del tiempo en la supervivencia de las CMMs y de las posibles consecuencias derivadas de la migración celular.

Resumo

Colgalo prefabricado en rato como vehículo de implantación de células nai en enxeñaría de tecidos.

Obxectivos: O obxectivo deste estudo é a creación dun modelo experimental en rato dun colgalo prefabricado como vehículo para a implantación de células nai mesenquimais (CNMs), determinar a influencia da prefabricación e do tempo na implantación e supervivencia das CNMs e finalmente ver se atopamos migración celular a distancia.

Materiais e métodos: CMMs foron illadas a partir de derivados do cordón umbilical e inxectadas no colgalo epigástrico illado da veciñanza. Os animais foron divididos aleatoriamente en 4 grupos segundo o momento do sacrificio. Realizáronse estudos histológicos e inmuno-histoquímico posteriores.

Resultados: Non hai diferenzas significativas na conta de CNMs dependendo do órgano en estudo. Os nosos datos suxiren que a variable tempo pode influír no descubrimento de CMMs. Atópanse CNMs lonxe do lugar inxectado, preferentemente no pulmón.

Conclusións: Este modelo confírmase como unha opción reproductíbel no campo da enxeñaría de tecidos. A prefabricación inflúe na implantación de CNMs. Son necesarios máis estudos que examinen a influencia do tempo sobre a supervivencia de MSCs e as posibles consecuencias da migración de células.

Abstract

Prefabricated flap in rat model as a vehicle for implantation of stem cells in tissue engineering.

Objectives: The aim of this study is the creation of an experimental model of a prefabricated flap in rat as a vehicle for implantation of mesenchymal stem cells (MSCs), to determine if prefabrication and time influence the implantation and survival of MSCs and to observe if there is cellular migration. **Materials and methods:** MSCs derived from umbilical cord were isolated and injected into an epigastric flap in rat isolated from the vicinity. The animals were randomly divided into 4 groups depending on the time of slaughter. Subsequently, histological and immunohistochemical studies were performed.

Results: There are significant differences in the MSCs count as a function of the organ studied. Our data suggest that the time variable may influence the finding of MSCs. MSCs are located remote from the injected organ, preferably at the lung.

Conclusions: This model is confirmed as a reproducible option in the field of tissue engineering. Prefabrication of the flap influences the implantation of MSCs. More studies are needed to analyze the influence of time on the survival of MSCs and the possible consequences of cell migration.

Índice

INTRODUCCIÓN.....	11
CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES.....	11
<i>Células madre mesenquimales derivadas de cordón umbilical.....</i>	<i>11</i>
COLGAJO.....	12
<i>Evolución histórica de la cirugía reconstructiva.....</i>	<i>12</i>
<i>Colgajos prefabricados.....</i>	<i>13</i>
INGENIERÍA TISULAR	14
OBJETIVOS.....	16
MATERIALES Y MÉTODOS	17
AISLAMIENTO Y CULTIVO	17
TRANSDUCCIÓN DE CÉLULAS MADRE CON GFP.....	17
CARACTERIZACIÓN DE CMMS	18
DISEÑO EXPERIMENTAL.....	21
<i>Colgajo cutáneo prefabricado con sustitutos cutáneos.....</i>	<i>22</i>
<i>Análisis clínicos, histológicos e inmunohistoquímicos</i>	<i>23</i>
RESULTADOS	25
CARACTERIZACIÓN CELULAR	25
SUPERVIVENCIA DEL COLGAJO Y EVALUACIÓN HISTOLÓGICA.....	28
EVALUACIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA Y ESTADÍSTICA.....	28
<i>Estadística</i>	<i>30</i>
DISCUSIÓN	39
REVISIÓN SISTEMÁTICA	39
INGENIERÍA TISULAR. EL PROBLEMA DE LA VASCULARIZACIÓN.....	40
COLGAJO EPIGÁSTRICO EN RATA COMO MODELO DE INGENIERÍA TISULAR	42
EFECTO DE LA PREFABRICACIÓN DEL COLGAJO EN LA SUPERVIVENCIA CELULAR. COMPORTAMIENTO CELULAR TRAS INYECCIÓN SUBDÉRMICA.	43
EFECTO DEL TIEMPO EN LA IMPLANTACIÓN DE LAS CÉLULAS MADRE	44
MIGRACIÓN TISULAR	44
LIMITACIONES DEL ESTUDIO	45
PERSPECTIVA DE FUTURO.....	46
CONCLUSIONES.....	47
BIBLIOGRAFÍA.....	48
ANEXO	65

Introducción

Células madre mesenquimales

Las células madre mesenquimales (CMMs) son células indiferenciadas con ilimitada capacidad de regeneración que se encuentran en la mayoría de órganos y tejidos, incluyendo músculo esquelético, páncreas, tejido adiposo y placenta [1]. Se ha probado además que son una fuente de células con capacidad de diferenciarse hacia diferentes líneas celulares como hueso, cartílago o tejido adiposo [2,3]. Fueron identificadas por primera vez en la médula ósea [4] y caracterizadas como una población de células madre multipotenciales no hematopoyéticas.

Células madre mesenquimales derivadas de cordón umbilical

Avances en la investigación han popularizado al cordón umbilical humano como fuente de obtención de CMMs. Este órgano postnatal es rico en células madre, las cuales durante su desarrollo muestran características típicas de CMMs como adherencia al plástico, morfología fibroblástica, expresión de unos determinados marcadores de superficie y diferenciación directa en líneas celulares mesodérmicas. Comparadas con la médula ósea, los tejidos del cordón umbilical contienen más células madre con un mayor potencial de expansión in vitro [5]. Se han descrito además propiedades inmunomoduladoras para células derivadas de cordón umbilical que ofrecen planteamientos muy interesantes aplicables al uso clínico. Debido a que el cordón umbilical es desechado tras el nacimiento, el acceso a la obtención de células es sencillo, no invasivo y no genera controversia [6].

Las CMMs de cordón umbilical tienen también la capacidad de formar neuronas y células de la glia [7] y transdiferenciarse en cardiomiocitos in vitro [8]. El primer uso de CMMs derivadas de cordón umbilical en seres humanos fue publicado por Wu et. al. [9] que observaron un mayor potencial proliferativo y un mayor efecto supresor en la proliferación de células mononucleares en sangre periférica comparado con la médula ósea. Las CMMs de cordón umbilical han demostrado ser

clínicamente útiles en el tratamiento de diferentes enfermedades, como lo han sido las CMMs derivadas de médula ósea y tejido adiposo [72] y además pueden ser aisladas en gran número en comparación con las CMMs de médula ósea, cuya fuente es más limitada [81].

Colgajo

Un colgajo es una porción de tejido que presenta una vascularización propia y que puede ser movilizado o trasplantado, basándonos en su pedículo vascular [142], para la reconstrucción de diferentes defectos en el cuerpo fundamentalmente tras un traumatismo o cáncer.

Evolución histórica de la cirugía reconstructiva

Los primeros registros de cirugía reconstructiva datan de alrededor del año 600 a.C. cuando el cirujano indio Susruta utiliza colgajos frontales para reparar deformidades nasales. No es hasta el año 1400 cuando la reparación tisular mediante colgajos llega a Europa. Los trabajos de Tagliacozzi son la primera muestra de ello. En su técnica utiliza un puente tisular entre el brazo y la cara para aportar piel de espesor total. La cirugía reconstructiva alcanza su mayor desarrollo durante la I y II Guerra mundial, en las que los daños por heridas y quemaduras tuvieron que ser acometidos por los cirujanos plásticos. [122] Mathes y Nahai introducen en 1982 la escalera reconstructiva que comenzaría con cierres por primera y segunda intención continuando con injertos de piel autólogos. Los siguientes escalones serían los colgajos regionales y locales, la expansión tisular y la transferencia libre de tejidos. A pesar de las grandes mejoras y refinamientos en todas estas técnicas siguen existiendo problemas y situaciones clínica que exigen un paso más en la escalera reconstructiva. Como respuesta a ello surgen técnicas novedosas que son el futuro potencial de la especialidad del siglo XXI: el trasplante alogénico de tejidos compuestos, la robótica, la medicina regenerativa y la ingeniería tisular [68].

Colgajos prefabricados

La prefabricación de un colgajo es una técnica complicada que responde a las necesidades de reconstrucciones quirúrgicas complejas. Aunque no se trata de una opción de primera elección su uso se ha popularizado a medida que la demanda de reconstrucciones más sofisticadas ha ido aumentando [14, 15]. El concepto de prefabricación de colgajos fue introducido por Shen en 1982 [16] y descrito como un procedimiento en 2 etapas: la introducción de un pedículo vascular en el cuerpo de un tejido que presenta unas características deseadas para la zona a reconstruir, seguido de la transferencia de este tejido vascularizado al defecto. De manera sencilla podemos decir que la técnica consistiría en la manipulación del tejido dentro del colgajo antes de trasplantarse a la zona que ha de ser reconstruida cuando las necesidades de la reconstrucción lo precisan, por ejemplo, en reconstrucciones faciales. Una de las mayores limitaciones de la ingeniería tisular a nivel de órganos es la inadecuada vascularización y por lo tanto pobre perfusión de la estructura de soporte celular [10]. La prefabricación de una matriz bioabsorbible puede crear una estructura bien perfundida a la cual se pueden añadir más y mayores subunidades. Experimentos basados en la implantación de células en matrices sintéticas han tenido éxito a la hora de reproducir estructuras simples, relativamente avasculares como cartílago o hueso pero han sido incapaces de crear órganos más complejos como hígados o riñones [11]. Por lo tanto la creación mediante ingeniería tisular en el laboratorio de estructuras complejas está limitada por la falta de vascularización adecuada. Para evitar la necesidad de crear mediante ingeniería tisular una red microcirculatoria funcional de novo, se ha desarrollado un modelo de ingeniería tisular que usa un lecho microcirculatorio preexistente en el cuerpo como estructura de soporte autóloga [12,13]. Este modelo usa segmentos de tejido vascularizado como lechos vasculares, con posibilidad de ser explantados y conectados a un biorreactor que permitiría la manipulación ex vivo, incluyendo el cultivo de células madre, transducción o incorporación de un sistema de soporte. Al ser la red vascular separada del organismo por un periodo finito de tiempo, se pueden manipular o modificar los tejidos [13]. Por lo tanto, este modelo aporta adecuada vascularización para la creación de diferentes estructuras mediante ingeniería tisular y sirve como vehículo de células madre; sin embargo, hay un tiempo limitado para la manipulación del tejido y el cultivo de células madre debido

a la necesidad de perfusión extracorporal. Es más, la necesidad de una anastomosis microvascular que permita la normal perfusión corpórea, incrementa la complejidad del modelo experimental. Este tipo de colgajos pueden servir como conductos a través de los cuales productos de la ingeniería tisular o tecnología de células madre pueden ser aplicados en la reconstrucción de defectos en distintas regiones del cuerpo [17]. Tejidos sintetizados in vitro con una textura, color o estructura adecuada pueden ser prelamados en un lugar previamente prefabricado [18]. Por lo tanto hay un campo de interés común a la medicina regenerativa y a la cirugía reconstructiva que es el problema central de la vascularización [19-21].

Ingeniería tisular

La ingeniería tisular se define como un campo interdisciplinar que aplica los principios de la ingeniería y de las ciencias de la salud hacia el desarrollo de tejidos biológicos que restauren, mantengan o mejoren la función tisular [22,23].

La promesa de recursos ilimitados para reemplazar la falta o el defecto de tejidos, es de vital importancia para la cirugía plástica del siglo XXI, que debe avanzar en el conocimiento de opciones reconstructivas[24,25].

Las tres estrategias fundamentales en ingeniería tisular propuestas por Langer y Vacanti en 1993 permanecen vigentes hoy en día.

1. Aislamiento celular: implica la identificación, aislamiento y manipulación de poblaciones celulares definidas capaces de aumentar el proceso reparativo y regenerador. En este sentido las CMMs representan la mejor opción de obtención de células progenitoras por su accesibilidad y la ausencia de problemas éticos y regulatorios que pueden presentar las células madre de origen embrionario.
2. Sustancias inductoras de tejidos: requiere el uso de señales bioquímicas y ambientales que modulen el comportamiento celular además de técnicas moleculares y genéticas que puedan ejercer este control. Factores de crecimiento, moléculas sintéticas [26], nanopartículas, microesferas [27-29] y transferencia genética mediante vectores virales y no virales [30,31] estarían implicados en esta regulación ambiental del desarrollo tisular.
3. Matrices: describe el uso de biomateriales naturales o sintéticos capaces de

dar soporte estructural, protección física además de permitir el desarrollo de los sistemas celulares y de señalización descritos previamente.

Estos tres principios de la ingeniería tisular pueden ser descritos en el contexto del paradigma de la medicina regenerativa “semilla vs. tierra” [32,33,34] en el que se resalta la importancia de factores no celulares como las fuerzas mecánicas, citoquinas, organización de la matriz o aporte de oxígeno (“tierra”) en la regulación del comportamiento celular (“semillas”).

La ingeniería tisular, no obstante, presenta a día de hoy, obstáculos importantes.

- Caracterizar y analizar el comportamiento de las células madre tras la manipulación ex vivo y el posterior implante.
- Mejorar las estrategias de vascularización, que en el momento actual limitan la producción de tejidos complejos y de mayor tamaño, debido a las deficiencias en el aporte sanguíneo.
- Mejoría de la interacción entre sistemas estructurales y células
- Ampliar el debate sobre restricciones legislativas, consideraciones éticas y valorar el incremento de los costes sanitarios que el desarrollo de la ingeniería tisular supone.

Objetivos

En este estudio, hemos investigado la reproducibilidad en la creación de un modelo vascular microcirculatorio pediculado, usando un colgajo cutáneo que es aislado de la vecindad mediante sustitutos cutáneos para evaluar el comportamiento de las CMMs cuando son inyectadas subcutáneamente en el colgajo. Nuestros objetivos son 4:

1. Creación de un modelo experimental en rata, de colgajo prefabricado como vehículo de implantación de células madre para el desarrollo posterior de un modelo de ingeniería tisular en cirugía reconstructiva.
2. Determinar si la prefabricación del colgajo influye en la supervivencia de células madre cuando son inyectadas subcutáneamente.
3. Determinar la influencia en el tiempo de la implantación de células madre en el colgajo prefabricado.
4. Observar si existe migración celular a distancia, es decir, en un punto diferente al lugar de administración de las CMMs.

Materiales y métodos

Aislamiento y Cultivo

Se aíslan CMMs a partir de cordones umbilicales obtenidos mediante cesáreas a mujeres sanas, en el Hospital Teresa Herrera de A Coruña bajo la supervisión del comité de ética del hospital. Los tejidos se obtienen previa firma del consentimiento informado y aprobación por parte del Comité de ética de Galicia.

Las células son aisladas del estroma del cordón umbilical mediante el uso del protocolo desarrollado por Arufe et al. [35,36]. El tejido se lava con tampón fosfato salino (PBS) y se corta en pequeñas piezas que denominamos explantes, los cuales son incubados por 3 periodos de 5 minutos en un medio enzimático que contiene 1,2 U/ml de dispasa y 112 U/ml de colagenasa tipo 1 (Sigma-Aldrich, St Louis, Mo). Posteriormente los explantes se cultivan en medio de cultivo Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) que contiene 10% de suero bovino fetal, 1% penicilina y 1% estreptomicina (Sigma-Aldrich) y son adheridos a la placa de cultivo. Después de 3 días los explantes son retirados de la placa de plástico, permaneciendo adheridas las células madre mesenquimales que son cultivadas en monocapa en el mismo medio. Cuando las células alcanzan un 90% de confluencia se extraen de la placa utilizando tripsina 2% (Sigma-Aldrich).

Transducción de células madre con GFP

-Procedimiento de clonación: Se amplifica ADN complementario humano (ADNc) de longitud completa, de proteína verde fluorescente (GFP) mediante reacción en cadena de la polimerasa, a partir de plásmidos A: pBABE-puroGFP-progerina y pBABE-puroGFP-lamina (Addgene) usando los oligonucleótidos: BamHI-LMNA-reverso: CGCGGATCCTTACATGATGCTGC-AGTTCTG y EcoRI-GFP-forward: CCGGAATTCATGGTGAGCAAGGGCGAG. La GFP, es clonada en pLVX-puro (Clontech

Laboratories Inc., Mountain View, CA) entre los sitios EcoRI / BamHI siguiendo los procedimientos estándar de clonación.

-Producción de lentivirus: El Lenti-X™ Lentiviral expression System (Clontech Laboratories Inc.) se utiliza siguiendo el protocolo del fabricante. Un día antes de la transducción, se colocan 4×10^6 células 293T productoras en placas de 100 mm de penicilina / estreptomicina-DMEM suplementado con 5% de FBS. Al día siguiente, se realiza una transducción diferente con base de fosfato de calcio, con LVX-GFP-puro. Las células se incuban durante la noche con la mezcla de la transducción, después se lavan con PBS y se incuban con 8 ml de medio de crecimiento completo fresco. Sobrenadantes virales se recogen a las 48 h, 60 h y 72 h después de la transfección, se centrifugan, se filtran para eliminar los residuos celulares y se almacenan a 4 ° C hasta completar la transducción.

-Transducción de CMMs humanas de cordón umbilical: Las células diana se cultivan en placas de 100 mm en 6×10^6 células por placa. Después de un día, las células alcanzan un 70% de confluencia. Las células se incuban secuencialmente con el sobrenadante viral de 48 horas, 60 horas, 72 horas durante 12 h. Después de la última transducción, las células se lavan y se incuban con medio de crecimiento nuevo para permitir la expresión de resistencia a puromicina. Dos días más tarde, la selección de puromicina se realiza mediante la incubación de las células en medio de crecimiento suplementado con 1 mg/ml de puromicina (Clontech Laboratories Inc.) durante cinco días. Después de la selección, las células transducidas se lavan y se dejan recuperar en medio completo durante dos días.

Caracterización de CMMs

Posteriormente se realiza la caracterización de las células madre mesenquimales-GFP mediante análisis genéticos (RT-PCR), inmunológicos (citometría de flujo) y biológicos (diferenciación hacia tres tipos celulares de la línea mesodérmica) de la siguiente manera:

-Análisis inmunológicos: las células son fijadas en paraformaldehído 4% en PBS. Después de su fijación la células son lavadas en dos ocasiones con PBS con Tritón X-100 0,1%, que actúa como tampón de permeabilización, durante 10 minutos. Los anticuerpos directos utilizados fueron: anticuerpo monoclonal de ratón anti CD34 humano conjugado con ficoeritrina (PE) (1:20; DakoCytomation, Barcelona, España), anticuerpo monoclonal de ratón anti CD90 humano conjugado con ficoeritrina-cianina (PE-Cy5) (1:20; BD Pharmagen, Madrid, España); anticuerpo monoclonal de ratón anti CD105 humano conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (1:100; Serotec, Bavaria, Alemania); anticuerpo monoclonal de ratón anti CD45 de ratón conjugado con FITC (1:20; BD Pharmingen) y anticuerpo monoclonal de ratón anti CD73 humano conjugado con PE (1:20; BD Pharmingen). Las células marcadas son lavadas con PBS en dos ocasiones y 10×10^5 células son analizadas con el citómetro de flujo FACSaria (BD Bioscience, Madrid, España). Los datos de la citometría de flujo son generados por el software DIVA (BD Bioscience).

-Análisis genéticos: se extrae ARN total de las células en cultivo usando el método reactivo Trizol L.S. (Invitrogen). La transcripción inversa (RT) se lleva a cabo utilizando el sistema Superscript II (Invitrogen). El ARN total (2 mg) se transcribe de forma inversa en un volumen de reacción de 20 µl que contiene Superscript II (200 unidades), cebadores aleatorios (25µM), y dNTP (0,5 mM cada uno) a 42°C durante 50 min. Posteriormente se realiza la reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (RT-PCR). Las secuencias reportadas de genes para SOX9 humana, Nanog, y Oct3/4, se utilizaron para el diseño del cebador. SOX9 se utiliza para comprobar la expresión del gen implicado en la condrogénesis etapa temprana. Nanog se utiliza para comprobar la expresión de genes implicados en etapas sin diferenciación. El programa de amplificación consiste en una desnaturalización inicial a 92°C durante 2 min, seguido de 40 ciclos a 92°C durante 15 s, hibridación a 61°C durante 30 s, y una extensión a 72°C durante 15 s. Cada análisis de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realiza por duplicado, con cada serie de ensayos repetidos 3 veces. Para minimizar los efectos de cantidades desiguales de ARN de partida y para eliminar las fuentes potenciales de incompatibilidad, los niveles de expresión relativos de cada gen se normalizaron a β -Actina utilizando el método 2-

$\Delta\Delta Ct$ (Livak y Schmittgen, 2001). Los experimentos de control no contenían transcriptasa inversa. (**Tabla 1**).

<i>Gene name</i>	<i>Fw primer</i>	<i>Rv primer</i>	<i>mRNA ID</i>	<i>AT (C°)</i>
SOX9	gtacccgcacttgacacac	tcgctctcgttcagaagtctc	NM_000346	61
NANOG	atgcctcacacggagactgt	aagtgggtgtttgcctttg	NM_024865	61
Oct3/4	ctcctggaggccaggaatc	atatacacaggccgatgtgg	DQ486513	61

Tabla1. Cebadores específicos para amplificación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Fw primer: Cebador 5'-3'. Rv primer: cebador 3'-5'. AT: Temperatura de hibridación.

-Análisis biológicos:

Diferenciación condrogénica. Las CMMs transducidas con GFP, son sembradas en placas de 96 pocillos (Sarstedt, Inc., Barcelona, SP) con 2×10^4 células por pocillo en medio DMEM con 10% de suero bovino fetal (FBS), 1% penicilina, 1% de estreptomicina, $1,5 \times 10^{-4}$ M monotioglicerol (MTG), 5 mg/ml de ácido ascórbico (AA), y 6 μ g/ml de transferrina (TRANS) (todos de Sigma-Aldrich) para facilitar la formación espontánea de esferoides. A continuación, se cambia el medio después de dos días a medio condrogénico compuesto de DMEM con 15% de suero de knockout (Gibco, Invitrogen, Barcelona, SP), 5 mg/ml de AA, 6 μ g/mL TRANS, 10 μ M de dexametasona (DEX), 1×10^{-7} M de ácido retinoico y 1 ng/mL factor de crecimiento transformante- $\beta 3$ recombinante humano (rhTGF- $\beta 3$) (ProSpec-Tany TechnoGene, Deltaclon, Madrid, SP). Este medio se cambia cada tres días. Después de 21 días en el medio condrogénico, los esferoides formados son recogidos, congelados y almacenados a -80°C para análisis posteriores. Secciones de espesor total (4 μ m) fueron obtenidas con criostato y se fijaron en paraformaldehído al 4% (Sigma-Aldrich) en PBS a pH 7,6. Algunas secciones se tiñen con Safranina O (Sigma-Aldrich) para evaluar la distribución de los proteoglicanos, en otros se realiza inmunotinción con anticuerpos monoclonales anti colágeno tipo 1 (COL1; 1:1000), colágeno tipo 2 (COL2; 1:50) y colágeno tipo 10 (COLX; 1:2000), metaloproteinasas de matriz 13 (MMP-13; 1:200) y aggrecan (AGG; 01:50) (Southern Biotechnologies, Birmingham, AL EE.UU.) y se tratan como describe Arufe et al. [37]

Diferenciación adipogénica y osteogénica. Las CMMs transducidas con GFP se siembran en placas de 96 pocillos (Sarstedt Inc.) a 2×10^4 células por pocillo en medio comercial adipogénico u osteogénico (Cambrex, Lonza, A Coruña, SP), siguiendo las instrucciones del fabricante, para evaluar el potencial de diferenciación mesodérmico. Los cultivos adipogénicos se tiñen con Rojo-O al aceite (Oil Red O) después de 21 días de cultivo. Para la tinción, las placas de cultivo fueron fijadas en 10 mM de peryodato de sodio, 2% de paraformaldehído, 75 mM de dihidrocloruro de L-lisina, y 37,5 mM de fosfato de sodio dibásico (Sigma-Aldrich) a pH 7,4 durante 15 min a temperatura ambiente, a continuación, se secan al aire y se tratan con una solución filtrada de 0,3% de Oil Red O para teñir vacuolas lipídicas. Después de 21 días de cultivo, los cultivos osteogénicos se tiñen con Rojo de Alizarina S para evaluar los depósitos de calcio. Después de la fijación, las células se cubren con solución de Rojo de Alizarina S 2% acuosa a pH 4,2 (Sigma-Aldrich) durante 3 min, después se lavan a fondo con agua destilada.

Diseño experimental

Se utilizan 24 ratas de tipo Wistar entre 200-300 mg de peso, respetando la legislación vigente sobre el uso de animales en experimentación. Todas las ratas son posicionadas para el procedimiento quirúrgico en decúbito supino y anestesiadas con isoflurano (8% para la inducción y 2% para mantenimiento) con oxígeno a 1 L/min.

Los animales son asignados aleatoriamente a 4 grupos diferentes (6 animales por cohorte):

-Grupo 1: Colgajo epigástrico prefabricado con inyección de 1 millón de CMMs-GFP. Sacrificio del animal a las 48 horas. Ratas 1, 13, 14, 15, 23 y 24.

-Grupo 2: Colgajo epigástrico prefabricado con inyección de 1 millón de CMMs-GFP. Sacrificio del animal a las 72 horas. Ratas 2, 11, 12, 18, 19 y 20.

-Grupo 3: Colgajo epigástrico prefabricado con inyección de 1 millón de CMMs-GFP. Sacrificio del animal al cabo de 1 semana. Ratas 5, 6, 7, 10, 21 y 22.

-Grupo 4: Colgajo epigástrico prefabricado con inyección de 1 millón de CMMs-GFP. Sacrificio del animal al cabo de 2 semanas. Ratas 3, 4, 8, 9, 16 y 17.

Basándonos en estudios previos [38], se decide administrar una inyección subcutánea de 10^6 CMMs-GFP en cada colgajo izquierdo.

Cuando las células cultivadas alcanzan un 90% de confluencia se extraen de la placa utilizando tripsina 2% (Sigma-Aldrich). Se procede a su recuento numérico mediante cámara de Neubauer. Las CMMs aisladas son diluidas en 0,5ml de suero salino e inyectadas subcutáneamente mediante múltiples depósitos con jeringa de insulina de 1ml con aguja de 29G en el colgajo izquierdo (**Figura 1**). El colgajo derecho sirve como control y en él se inyecta suero salino sin CMMs.

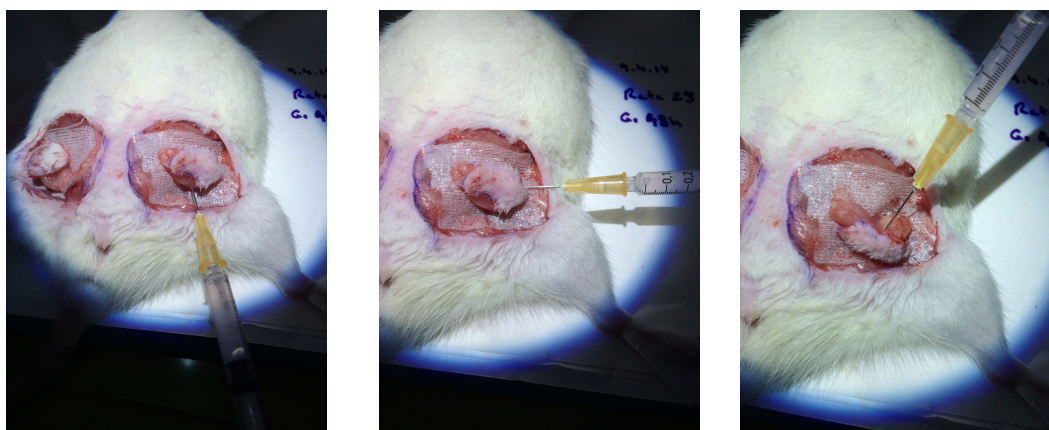


Figura 1. Proceso de inyección subcutánea de células madre mesenquimales marcadas con GFP. Se infiltran en 0,5ml de suero 10^6 CMM-GFP a nivel de tejido celular subcutáneo mediante múltiples inyecciones en el colgajo.

Colgajo cutáneo prefabricado con sustitutos cutáneos

El colgajo que empleamos es el colgajo epigástrico, utilizado habitualmente en nuestra unidad de cirugía experimental como modelo de colgajo libre [39]. Se realiza la disección del colgajo bajo anestesia general y con ayuda de microscopio de aumento. El colgajo inguinal de vasos epigástricos es un colgajo con aporte vascular constante y muy conocido tanto en el ámbito de la investigación como en el campo del entrenamiento quirúrgico. Se diseña el colgajo epigástrico basándonos en los vasos epigástricos inferiores superficiales, con dimensiones aproximadas de 3x3 cm. Se llevó a cabo la prefabricación del colgajo aislándolo de los tejidos circundantes mediante un sustituto dérmico. Empleamos Biobrane (Smith & Nephew, Barcelona)

que es un sustituto de piel biosintético que se adhiere a la dermis facilitando la recuperación de la función estructural y biológica. Está formado por una estructura de dos capas. La capa exterior de silicona, que actúa como barrera epidérmica protectora y evita la pérdida de agua por evaporación. La capa interior, parcialmente integrada en la capa de silicona, compuesta por una red tridimensional de filamentos de nylon entretejidos, sobre los que se disponen péptidos de colágeno porcino. El colgajo queda unido solamente por su pedículo vascular. El sustituto dérmico es recortado con la forma del defecto y suturado a la piel circundante y a la del colgajo mediante seda 2/0 (**Figura 2**). Para prevenir la autofagia se coloca un collar isabelino de plástico al animal alrededor del cuello. Después de la operación las ratas fueron alojadas en un ambiente lumínico controlado y con acceso *ad libitum* a alimentos y agua.

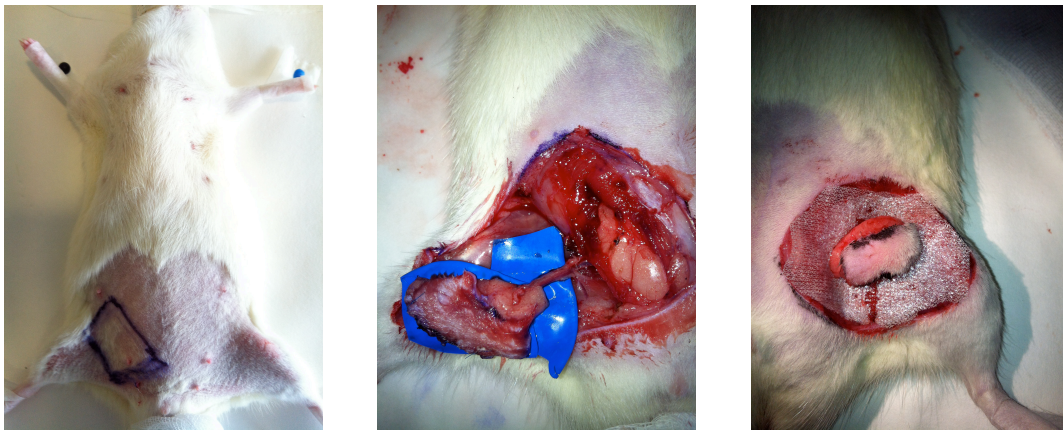


Figura 2. 1. Diseño del colgajo epigástrico en rata Wistar. 2. Imagen del colgajo epigástrico pediculado por su eje vascular, los vasos epigástricos superficiales. 3. Colgajo epigástrico aislado del tejido circundante por medio de sustituto dérmico Biobrane®.

Análisis clínicos, histológicos e inmunohistoquímicos

Se realizan las evaluaciones al cabo de 48 horas, 72 horas, 1 semana o 2 semanas en función del grupo de pertenencia del animal. La viabilidad del colgajo fue evaluada mediante inspección clínica (color y relleno capilar) y examinación histológica.

Una vez obtenidos los colgajos mediante disección quirúrgica en la sala de necropsias, son desprovistos de la piel, y se realizan cortes de espesor total (4 μ m) con criostato que son fijados en paraformaldehído al 4% (Sigma-Aldrich) en PBS a

pH 7,6. Además de los dos colgajos epigástricos se recogen también los siguientes órganos: corazón, pulmón, hígado, riñón izquierdo, riñón derecho, intestino delgado, intestino grueso, bazo, ganglio linfático, páncreas, tiroides, músculo (oblicuo externo o gracilis) izquierdo y derecho (**Figura 3**). Al menos tres cortes histológicos de cada órgano son sometido a la técnica de tinción clásica con hematoxilina-eosina, que nos permite evaluar parámetros de viabilidad tisular mediante microscopio de luz. Para marcar el resto de células y obtener un contraste, que posteriormente se analiza en la observación al microscopio, se utiliza 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) para contracolorar el núcleo celular, emitiendo fluorescencia de color azul.



Figura 3. 1. Imagen previa a necropsia del animal. Se puede apreciar el buen aspecto y viabilidad de ambos colgajos. 2. Detalle de colgajo epigástrico izquierdo. Se observa el pedículo vascular y la malla de Biobrane. 3. Relación de órganos preparados para estudio. De izquierda a derecha y de arriba abajo: Colgajo izquierdo, colgajo derecho, corazón. Pulmón, hígado, riñón izquierdo, riñón derecho, intestino delgado, intestino grueso, bazo, tiroides, páncreas, músculo izquierdo, músculo derecho, y ganglio linfático.

Resultados

Caracterización celular

La caracterización de las poblaciones de CMMs aisladas de cordón umbilical se realizó utilizando análisis de citometría de flujo antes de los estudios de diferenciación para determinar su multipotencia. Un alto porcentaje de CMMs fueron positivas para CD90 (> 90%), mientras que un porcentaje inferior de células fueron positivas para CD44 (>50%), CD105 (60%) y CD73 (40%). Los marcadores de la prueba restantes fueron CD34 y CD45 con <1% de células positivas. (*Figura 5*).

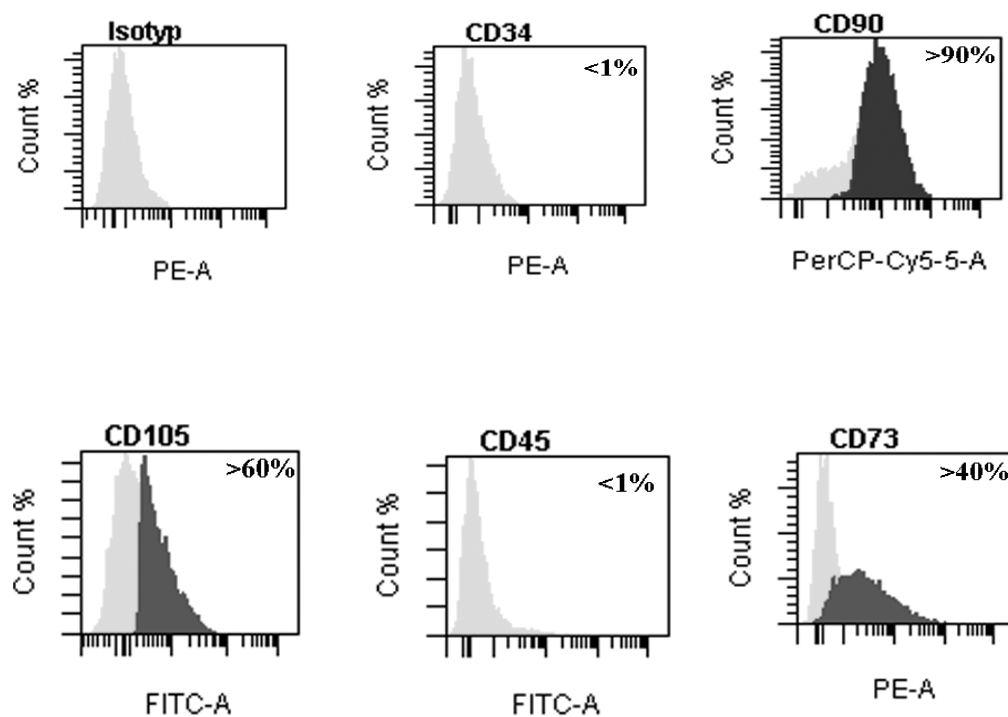


Figura 5. Caracterización de CMMs mediante citometría de flujo. Los marcadores de CMMs se indican en la parte superior de cada recuadro. En la parte inferior figura el fluorocromo usado. El porcentaje corresponde al número de células que son positivas para cada marcador.

La multipotencialidad de la población de CMMs antes de la diferenciación también se puso a prueba por RT-PCR para la expresión de los genes SOX9 , Nanog y Oct3/4. Todas las mediciones se comparan con la expresión génica de OCT3/4 en la población de CMMs, porque este gen tenía el nivel más bajo de expresión. (**Figura 6**).

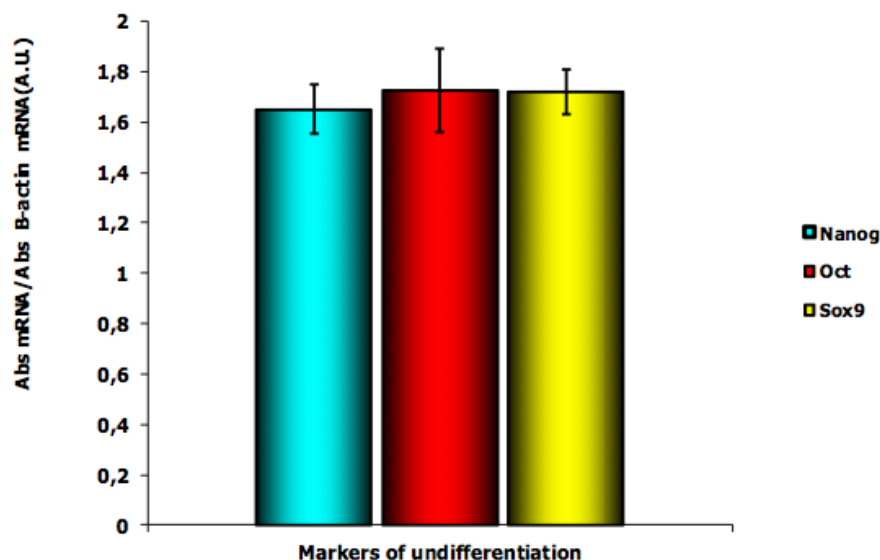


Figura 6. Caracterización de CMMs mediante transcripción inversa de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR). El porcentaje de expresión génica está indicado en el eje y, los genes utilizados (Nanog, Oct y Sox9) aparecen en el eje x.

En cuanto a la condrogénesis, el estudio se centró en la expresión de COL2 y COL1 mediante inmunohistoquímica de secciones de esferoides. La hipertrofia en este modelo condrogénico particular también se evaluó mediante inmunohistoquímica para COLX. Específicamente, la subpoblación de MSC mostró una disminución en la tinción COL1 con el tiempo, después de 14 días en medio condrogénico; este nivel de tinción COL1 se mantuvo después de 14 días en cultivo. La tinción para COL2 estaba presente en la población CMMs cultivadas en medio condrogénico en todo momento, aumentando en intensidad para llegar al nivel más alto de tinción a los 28 y 46 días. Durante la condrogénesis, la tinción para COLX se mantuvo en el mismo nivel a lo largo de todo el período (4-46 días), sin diferencias significativas en su expresión. (**Figura 7**).

Después de 21 días de diferenciación osteogénica, como se describió anteriormente, casi el 100% de las células sembradas en los pocillos fueron positivas para Rojo de Alizarina. Después de 21 días de diferenciación adipogénica, como se describió anteriormente, casi el 100% de las células sembradas fueron positivas para tinción Rojo-O al aceite. (**Figura 8**).

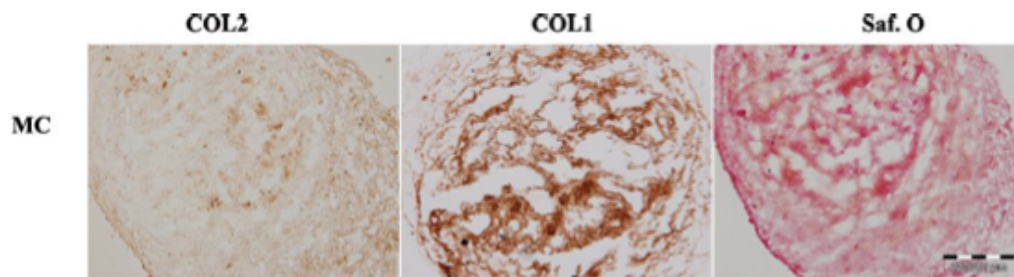


Figura 7. Análisis inmunohistoquímico de condrogénesis en esferoides derivados de CMMs después de cultivo en medio de diferenciación condrogénica. Todas las figuras corresponden a una magnificación óptica 20x. COL1: anticuerpos monoclonales anti colágeno tipo 1. COL 2: anticuerpos monoclonales anti colágeno tipo 2. Saf. O: safranina O.

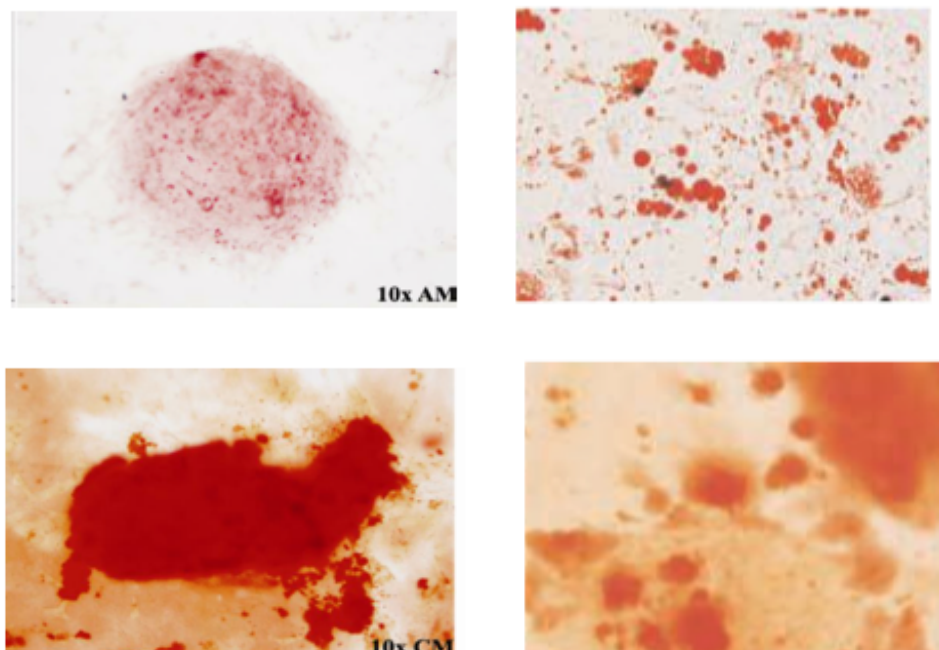


Figura 8. Diferenciación de CMMs-GFP hacia líneas mesodérmicas osteogénica y adipogénica. Se aislaron y cultivaron durante 21 días CMMs-GFP en medio comercial osteogénico y adipogénico (Cambrex, A coruña). Los adipocitos se tiñeron con Rojo-O al aceite (Oil red O) y los osteoblastos con Rojo de Alizarina (Alizarin red). Magnificación 10x.

Supervivencia del colgajo y evaluación histológica

Todos los animales sobrevivieron al periodo de estudio y pudieron ser evaluados. La supervivencia del colgajo fue confirmada en todos los animales mediante evaluación macroscópica y también mediante examen histológico de tejido viable bajo microscopio de luz. Se observó únicamente un área de sufrimiento cutáneo y necrosis en el colgajo derecho de la rata nº 11, que corresponde a aproximadamente un 5-10% de la superficie del colgajo. Histológicamente, las muestras obtenidas mostraron viabilidad del colgajo y hallazgos de respuesta inflamatoria, correspondiente al proceso de cicatrización como infiltrado de células inflamatorias, presencia de tejido fibroso y en alguna ocasión necrosis mínima del borde del colgajo (**Figura 9**).

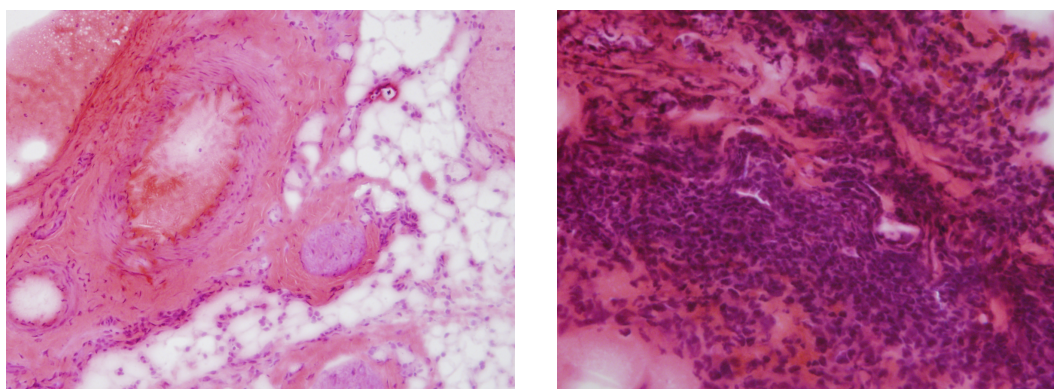


Figura 9. Cortes histológicos de los colgajos con tinción hematoxilina-eosina. Se registró viabilidad tisular e infiltrado inflamatorio (derecha) en todos colgajos realizados.

Evaluación inmunohistoquímica y estadística.

El análisis inmunohistoquímico se realizó mediante microscopio de inmunofluorescencia Olympus BX51 (Olympus) y reveló la presencia de CMMs mediante emisión fluorescente de GFP en todos los colgajos izquierdos (**Figura 10**). Se analizaron muestras de los colgajos epigástricos izquierdo y derecho y también de los siguientes órganos: corazón, pulmón, hígado, riñón izquierdo, riñón derecho, intestino delgado, intestino grueso, bazo, ganglio linfático, páncreas, tiroides, músculo (oblicuo externo o gracilis) izquierdo y derecho (**Figura 3**). Se

estudian en microscopio electrónico 6 portas con tinción DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindol) de cada colgajo y órgano que incluyen cortes de espesor total (4 µm) realizados con criostato. Además tres cortes histológicos de cada órgano fueron sometido a la técnica de tinción clásica con hematoxilina-eosina, que nos permite evaluar parámetros de viabilidad tisular mediante microscopio de luz.

Buscábamos células GFP en 4 grupos de 6 ratas cada uno correspondientes a distintos momentos de sacrificio del animal: 48 horas, 72 horas, 1 semana y 2 semanas.

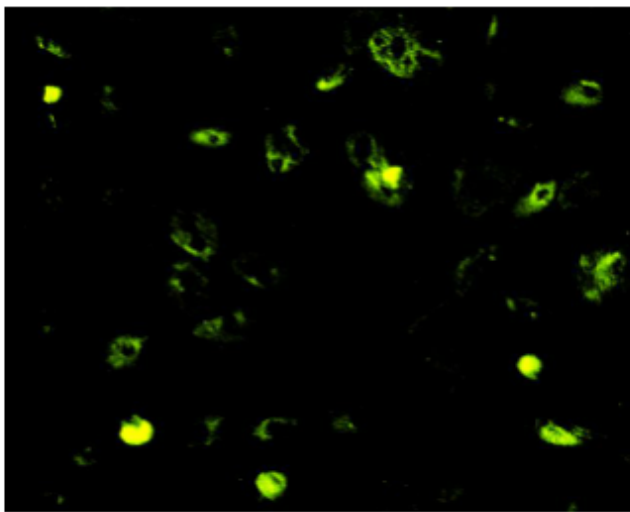


Figura 10. Imagen de microscopio de fluorescencia correspondiente a CMMs expresando GFP 40x.

Estadística

-Número de células GFP totales

Se encontraron células GFP en todas las ratas. El máximo número de células GFP se encontró en la Rata 13 (grupo 48h), 28 GFP.

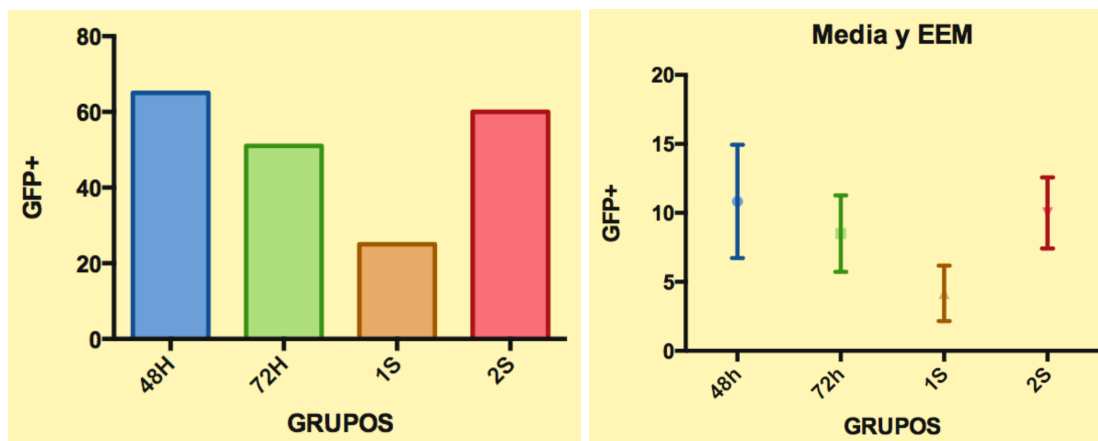


Gráfico 1. Número total y media de células GFP encontradas en cada grupo (48 horas, 72 horas, 1 semana y 2 semanas). EEM: error estándar de la media.

El número total de células GFP por grupos es el siguiente: Grupo 48 h N=65 GFP; Grupo 72 h N=51 GFP; Grupo 1 semana N=25 GFP; Grupo 2 semanas N= 60 GFP. El total de células GFP encontradas fue de 201 GFP. **(Gráfico 1)**

-Células GFP en colgajo izquierdo

Se hallaron células GFP en el colgajo izquierdo de todas las ratas excepto en tres ratas del grupo de 1 semana (ratas 6, 7 y 21). El máximo número de células GFP en colgajo izquierdo lo encontramos en la Rata 13 (grupo 48h), 17 GFP.

La media de número de células GFP encontrada en los colgajos izquierdos (lugar de inyección) fue el siguiente:

Grupo 48 h: 7,1 células/rata (análisis de 6 portas).

Grupo 72 h: 5,2 células/rata (análisis de 6 portas).

Grupo 1 semana: 2,5 células/rata (análisis de 6 portas).

Grupo 2 semanas: 5,6 células/rata (análisis de 6 portas).

Al realizar el test de Wilcoxon para comparar el número de células GFP halladas en el colgajo izquierdo respecto a las halladas en el colgajo derecho (colgajo control) obtuvimos los siguientes resultados. **(Gráfico 2)**

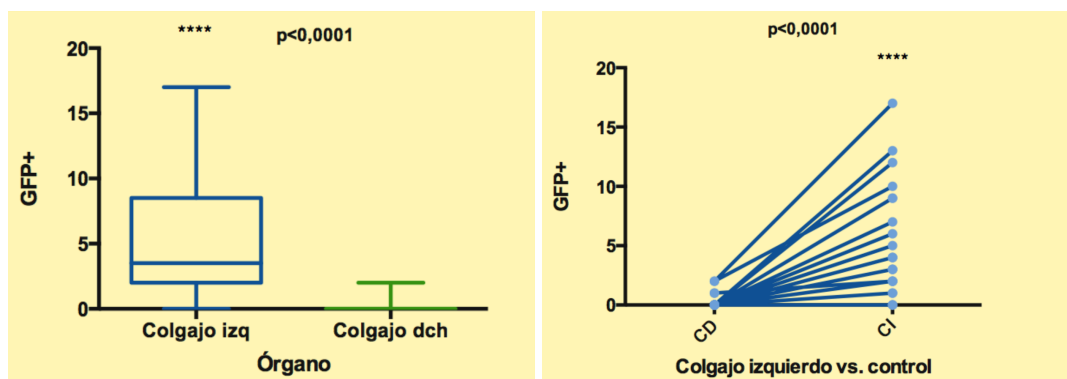


Gráfico 2. Comparación de células GFP halladas en colgajo izquierdo respecto a control (colgajo derecho). El valor de $p < 0,0001$ obtenido mediante test de Wilcoxon es considerado significativo.

La diferencia en hallazgo de células GFP es estadísticamente significativa entre los dos colgajos.

-Células GFP en los diferentes órganos analizados

	Nº ratas GFP+ (%)	Células GFP+	<i>p</i> -value (grupos tiempo)
Colgajo izquierdo	21 (87,5)	119	.328
Colgajo derecho	3 (12,5)	5	.775
Corazón	2 (8,3)	3	.248
Pulmón	11 (45)	26	.485
Hígado	6 (25)	13	.163
Riñón izquierdo	4 (16)	5	.204
Riñón derecho	4 (16)	4	.512
Intestino delgado	1 (4,1)	1	.391
Intestino grueso	3 (12,5)	3	.259
Bazo	3 (12,5)	4	.775
Ganglio	10 (41,6)	13	.424
Tiroides	1 (4,1)	1	.391
Páncreas	0	0	0
Músculo izquierdo	3 (12,5)	4	.248
Músculo derecho	0	0	0

El valor de p corresponde a la realización de test de Kruskal-Wallis comparando diferencias en el hallazgo de células GFP en cada uno de los órganos en función de los grupos de tiempo (48h, 72h, 1 semana y 2 semanas). En ninguno de los órganos se encuentran diferencias significativas.

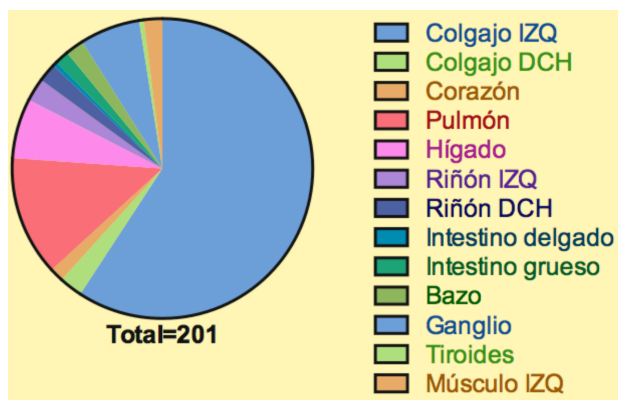


Gráfico 3. Distribución del total de células GFP en os distintos órganos analizados.

-Por grupos, la distribución fue la siguiente:

Grupo 48h:

	Nº ratas GFP+ (%)	Células GFP+
Colgajo izquierdo	6 (100)	42
Colgajo derecho	1 (16,6)	2
Corazón	0	1
Pulmón	2 (33,3)	5
Hígado	2 (33,3)	3
Riñón izquierdo	2 (33,3)	2
Riñón derecho	2 (33,3)	2
Intestino delgado	1 (16,6)	1
Intestino grueso	2 (33,3)	2
Bazo	1 (16,6)	1
Ganglio	4 (66,6)	4
Tiroides	0	0
Páncreas	0	0
Músculo izquierdo	0	0
Músculo derecho	0	0

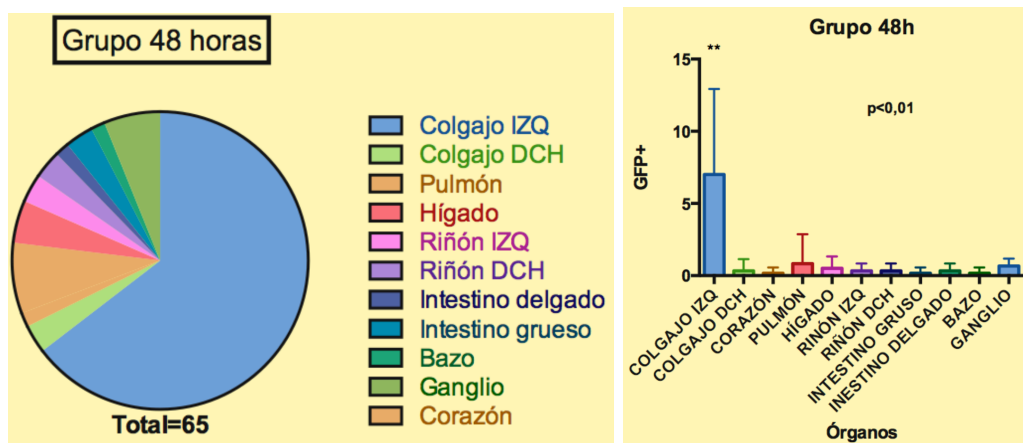


Gráfico 4. Distribución de células GFP en el grupo de 48 horas. (*p <0,01) Kruskal-Wallis test.

Grupo 72h:

	Nº ratas GFP+ (%)	Células GFP+
Colgajo izquierdo	6 (100)	26
Colgajo derecho	1 (16,6)	1
Corazón	2 (33,3)	3
Pulmón	4 (66,6)	7
Hígado	1 (16,6)	1
Riñón izquierdo	1 (16,6)	3
Riñón derecho	1 (16,6)	1
Intestino delgado	0	0
Intestino grueso	0	0
Bazo	1 (16,6)	1
Ganglio	3 (50)	5
Tiroides	0	0
Páncreas	0	0
Músculo izquierdo	2 (33,3)	3
Músculo derecho	0	0

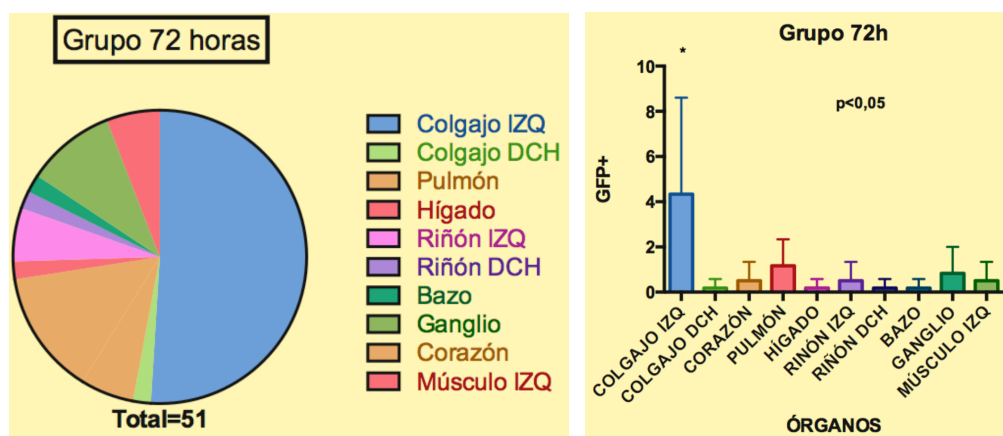


Gráfico 5. Distribución de células GFP en el grupo de 72 horas. (*p < 0,05) Kruskal-Wallis test.

Grupo 1 semana:

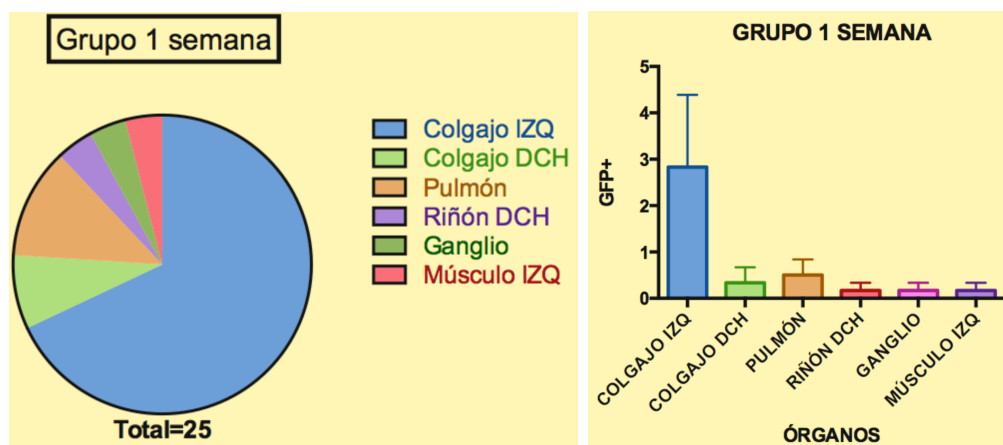


Gráfico 6. Distribución de células GFP en el grupo de 72 horas.

Tabla D. Distribución de células GFP+ Grupo 1 semana		
	Nº ratas GFP+ (%)	Células GFP+
Colgajo izquierdo	3 (50)	17
Colgajo derecho	1 (16,6)	2
Corazón	0	0
Pulmón	2 (33,3)	3
Hígado	0	0
Riñón izquierdo	0	0
Riñón derecho	1 (16,6)	1
Intestino delgado	0	0
Intestino grueso	0	0
Bazo	0	0
Ganglio	1 (16,6)	1
Tiroides	0	0
Páncreas	0	0
Músculo izquierdo	1 (16,6)	1
Músculo derecho	0	0

Grupo 2 semanas:

Tabla E. Distribución de células GFP+ Grupo 2 semanas		
	Nº ratas GFP+ (%)	Células GFP+
Colgajo izquierdo	6 (100)	34
Colgajo derecho	0	0
Corazón	0	0
Pulmón	3 (50)	10
Hígado	2 (33,3)	9
Riñón izquierdo	0	0
Riñón derecho	0	0
Intestino delgado	0	0
Intestino grueso	1 (16,6)	1
Bazo	1 (16,6)	2
Ganglio	2 (33,3)	3
Tiroides	1 (16,6)	1
Páncreas	0	0
Músculo izquierdo	0	0
Músculo derecho	0	0

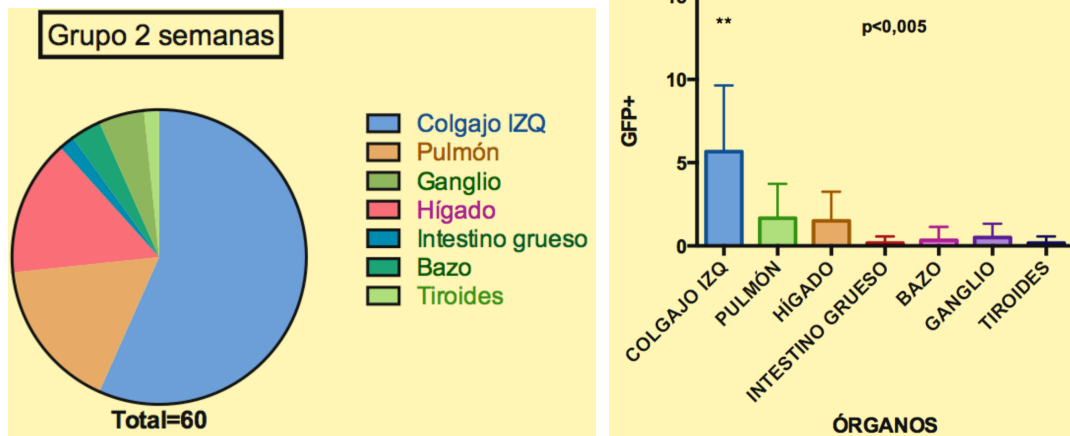
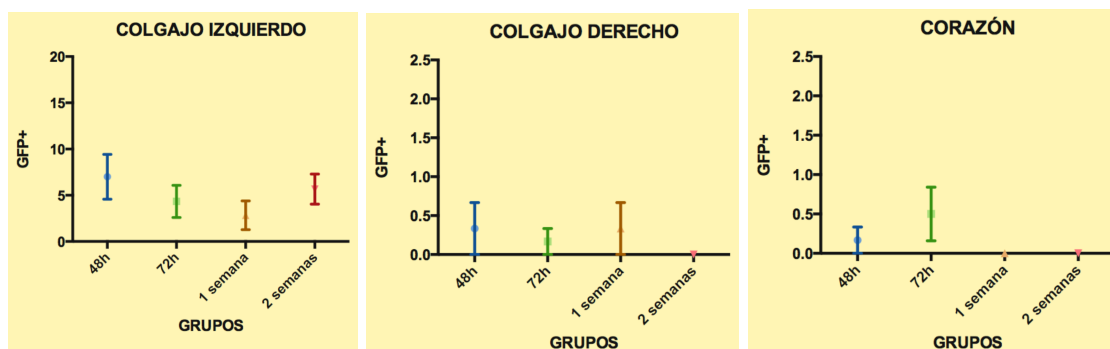


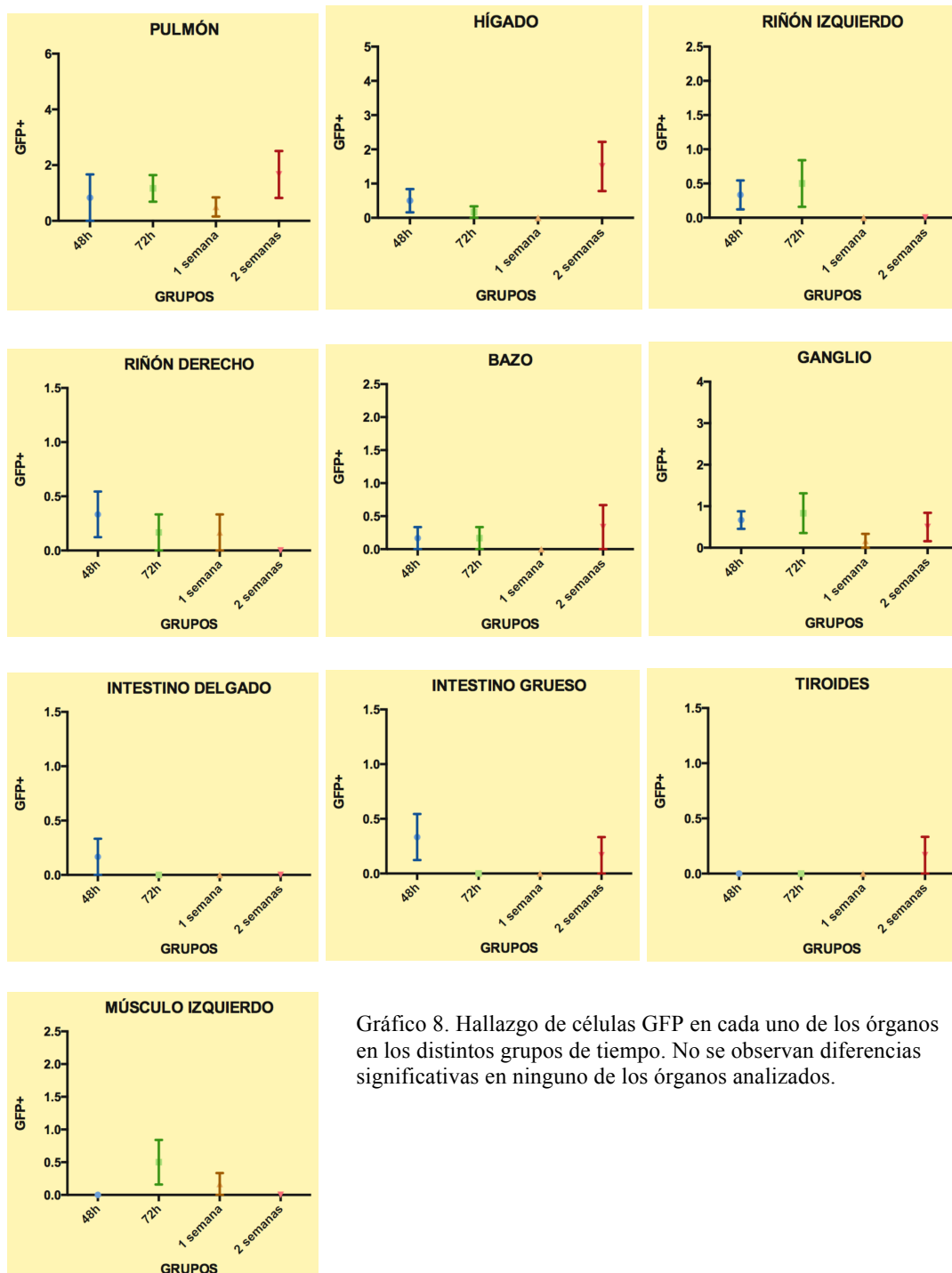
Gráfico 7. Distribución de células GFP en el grupo de 2 semanas. (*p <0,005) Kruskal-Wallis test.

Uno de los objetivos del proyecto era analizar la variable tiempo, por lo que se distribuyeron las ratas en cuatro grupos: 48 horas, 72 horas, 1 semana y 2 semanas, momentos en que se sacrificaron y posteriormente se realizaron las necropsias para observar las muestras de tejido al microscopio.

Se realizó el test de Kruskal-Wallis para observar la influencia del tiempo en la observación de células GFP en cada uno de los colgajos y órganos. El test de Kruskal-Wallis es un método similar al análisis de la varianza pero de tipo no paramétrico. Nuestra hipótesis nula sería la igualdad de medianas y la hipótesis alternativa sería que la variable tiempo afecta de manera estadísticamente significativa en la observación de células GFP.

Los resultados se muestran en el siguiente gráfico. (**Gráfico 8**)





Como se puede observar en ninguno de los grupos se encontraron diferencias estadísticamente significativas, por lo que no podemos rechazar la hipótesis nula de que las medianas halladas en cada uno de los grupos sean iguales.

A continuación usamos una Anova de dos vías para comparar en su conjunto el efecto tanto del tiempo cómo del órgano analizado en la búsqueda de células GFP, y obtuvimos el siguiente resultado. **(Gráfico 9)**

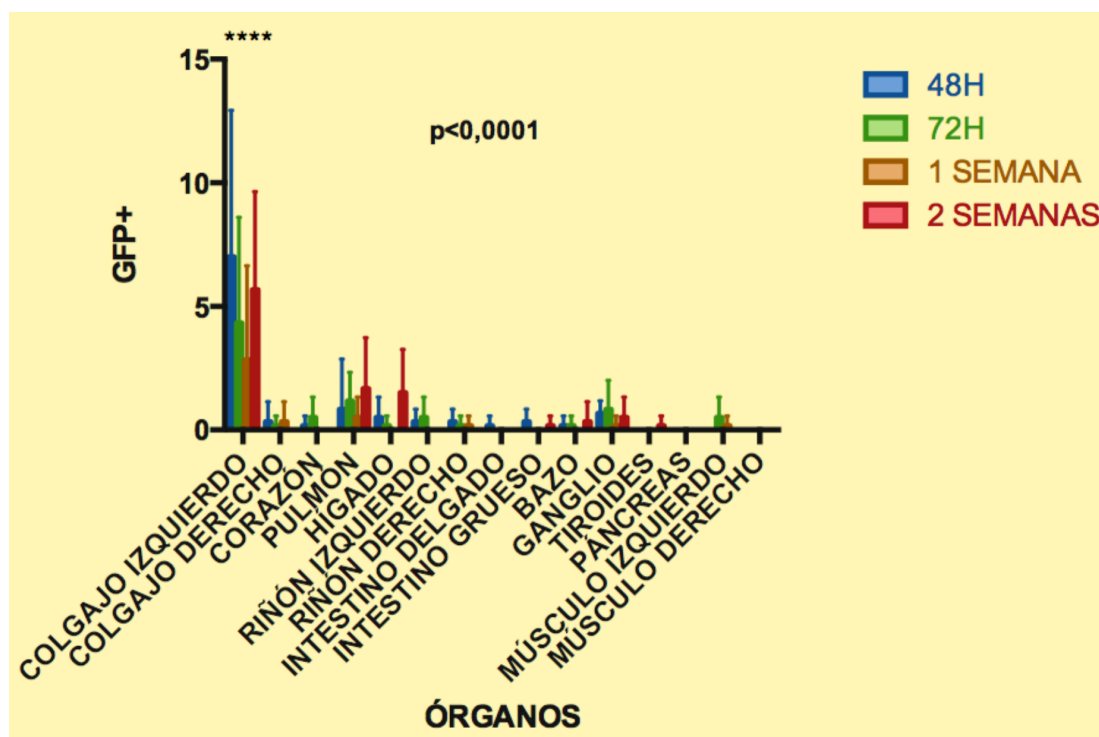


Gráfico 9. Distribución de células GFP en los distintos órganos y grupos de tiempo. (*p <0,001) ANOVA de dos vías.

No existe interacción entre los dos factores, es decir, el hallazgo de células GFP en uno de los grupos de tiempo no depende del órgano analizado y a la inversa. Por otro lado, sí que se encuentran diferencias en el hallazgo de células GFP en función del órgano analizado. No ocurre lo mismo con la variable tiempo.

Por último, aunque como hemos visto, la variable tiempo no influye de manera significativa en la observación de células GFP, si observamos la distribución de GFP en función de los 4 grupos en los órganos en donde más GFP encontramos (colgajo izquierdo, pulmón, hígado y ganglio linfático) vemos que se produce una disminución en el hallazgo de células GFP en el grupo de 1 semana, volviendo a aumentar su presencia en el grupo de 2 semanas. **(Gráfico 8)**

Además se captó emisión fluorescente en los folículos pilosos y en detritos procedentes de gasas, en todos los grupos, considerándose un artefacto.

Discusión

Revisión sistemática

Para obtener una visión global de la materia a estudio y buscando evidencia científica realizamos una revisión sistemática en MEDLINE, Embase y Cochrane Library incluyendo los términos “mesenchymal stem cells”, “flap” y “plastic surgery”. Se encontraron en total 124 artículos Cochrane N=1, Embase N=57 y PubMed N=67. Las citaciones se revisaron mediante título y abstract, sin restricción por lenguaje. Publicaciones anteriores al año 2000 fueron consideradas como criterio de exclusión. No se llevaron a cabo asignación de nivel de evidencia ni metaanálisis por la heterogeneidad de los artículos revisados. Se descartaron 24 artículos por encontrarse repetidos, 14 por no presentar interés o relevancia para el objeto estudiado. Los 86 artículos finales seleccionados fueron analizados mediante lectura del texto completo.

Creemos oportuna la siguiente división por categorías para facilitar su resumen y comprensión.

1. Ingeniería tisular / prefabricación de colgajos N=35 [41-73]

Se documenta el uso de células madre en la prefabricación de colgajos para reconstrucción facial en monobloque [43], traquea [44,63], hueso [45,48], neocartílago [47], músculo esquelético [46,53], uretra [62], tejidos blandos [59] o para la mejoría de la supervivencia de colgajos mediante cámaras creadas mediante ingeniería tisular [41,42].

2. CMMs y viabilidad del colgajo N=24 [74-97]

La cobertura de defectos tisulares, causados por traumatismos o ablaciones en pacientes con cáncer, mediante el uso de colgajos es una estrategia quirúrgica básica en cirugía plástica y reconstructiva. La necrosis total o parcial del colgajo es una complicación postoperatoria frecuente. Se han propuesto muchas teorías acerca de este problema, de las cuales la del deficiente aporte vascular es la más aceptada. El empleo de CMMs incrementa la tasa de supervivencia de los colgajos a través de su potencial vasculogénico. En diferentes estudios se encuentra un aumento de la

expresión de VEGF, bFGF, HIF-1 α , aumento de la densidad de los microvasos y de la perfusión del colgajo. Además se ha demostrado que las CMMs incrementan la supervivencia de colgajos sometidos a daño por el fenómeno de isquemia-reperfusión [75,80].

3. Regeneración tisular N=12 [98-109]

Los diferentes artículos exponen beneficios de la inyección de CMMs en piel o músculo ulcerados después de la exposición a altas dosis de radiación [101,102,107], en el manejo de úlceras crónicas [106] y cura de heridas [102].

4. CMMs e injertos de grasa N=6 [110-115]

Existe un incremento del uso de injertos de grasa en el campo de la cirugía reconstructiva y estética. No obstante, tasas de reabsorción publicadas de entre 25% y 80% han promovido la búsqueda de métodos para incrementar la viabilidad del injerto. En este sentido, el enriquecimiento del injerto graso con células madre derivadas de tejido adiposo convierte al relleno con grasa en una alternativa fehaciente para el aumento tisular. El aumento de la angiogénesis promovido por las CMMs parece determinante como mecanismo de aumento de supervivencia de estos injertos [112].

5. Obtención células madre N=6 [116-121]

Se recogen artículos que estudian fuentes de obtención de CMMs, medios de cultivo y vías de administración.

6. Otros N=3 [122-123]

Ingeniería tisular. El problema de la vascularización.

La ingeniería tisular es un campo relativamente joven en la investigación pero con un gran potencial de desarrollo. La aplicación para uso clínico de la ingeniería tisular se basa en la utilización de células madre. La investigación reciente ha comenzado a explorar las posibilidades de reemplazamiento tisular y rejuvenecimiento a partir de las propias células madre del paciente [124]. Las células madre mesenquimales son progenitores celulares multipotenciales capaces de diferenciarse en tejidos de origen mesodérmico, como hueso, grasa, músculo, cartílago y vasos sanguíneos [125].

En el campo de la cirugía reconstructiva, cuando grandes defectos necesitan ser reconstruidos, habitualmente se utilizan técnicas que se basan en el transporte de tejidos propios del paciente (colgajos). Aunque la reconstrucción con colgajos ha conseguido buenos resultados en la reparación de defectos asociados al cáncer o a los traumatismos, todavía existen limitaciones fundamentalmente debidas a la dificultad de reconstruir zonas anatómicas específicas como la zona centrofacial (boca, nariz, lengua) de manera satisfactoria.

La ingeniería tisular supone un campo en expansión y provee potencialmente la posibilidad de generar estructuras complejas en el laboratorio. El uso de CMMs en ingeniería tisular, en combinación con una apropiada estructura de soporte, parece ser muy prometedor como guía en la neoformación tisular tras la implantación en el receptor [126-128].

Una de las limitaciones en la actualidad es la incapacidad de crear grandes segmentos de tejido o tejidos compuestos, fundamentalmente porque los materiales sintéticos utilizados como soporte de las células no aportan vascularización por lo que grandes segmentos de tejido no son viables para trasplantar al paciente. La posibilidad de reconstruir defectos compuestos por diferentes tejidos (piel, hueso, cartílago, músculo, grasa y vasos sanguíneos) como una nariz, lengua o oreja con ingeniería tisular, depende en gran medida de transferir células con la capacidades de diferenciarse a cada tejido y que el vehículo o scaffold en las que son trasplantadas estas celular les provea de una adecuada vascularización que les permita sobrevivir. En este sentido la mayor parte de los scaffolds o estructuras de soporte descritas hasta fecha en la literatura se componen de materiales sintéticos cuyo defecto está en la falta de vascularización de grandes segmentos de tejidos. El desarrollo de una adecuada vascularización que mantenga a las células implantadas es crucial porque la introducción de una red capilar abundante va a aportar suficientes nutrientes y oxígeno a las células y va a extraer metabolitos procedentes de la degradación [129]. Se trata pues de maximizar la viabilidad celular y promover la supervivencia temprana de la célula in vivo. Se han desarrollado diferentes estrategias para aumentar la vascularización en los modelos de ingeniería tisular [130,131]. Algunas de estas estrategias incorporan técnicas microvasculares en la creación de diferentes vehículos biológicos como el implante de un haz vascular arteriovenoso [132] o el uso de camas microvasculares autólogas [12]. Este último

ejemplo, es en esencia un colgajo libre que es explantado a un sistema biorreactor, que permite la manipulación ex vivo, incluyendo la inyección de CMMs para fabricar una construcción que puede ser reconectada a la circulación sistémica del receptor mediante anastomosis microvascular. El uso de tejido prescindible como portador de un sistema microcirculatorio, basado en un pedículo vascular, ha demostrado ser efectivo en el implante de células madre y como vehículo para terapia génica [16].

Colgajo epigástrico en rata como modelo de ingeniería tisular

En nuestro estudio hemos pretendido modificar este modelo creando un colgajo pediculado prefabricado aislado del tejido circundante mediante sustitutos dérmicos, con el objetivo de disminuir la complejidad en el modelo experimental así como de valorar la influencia de la prefabricación del colgajo en la siembra de CMMs. También hemos querido evaluar la influencia del tiempo en la siembra celular. En este experimento pretendemos combinar la aplicación de colgajos prefabricados con ingeniería tisular con el fin de demostrar que la vascularización está asegurada a través del colgajo que además actúa como “andamio inteligente” promoviendo el acoplamiento, crecimiento y diferenciación celular con la potencialidad de desarrollar modelos aplicables en cirugía reconstructiva. Hemos utilizado el colgajo epigástrico en rata porque es un modelo experimental bien conocido y comúnmente usado en investigación microvascular como colgajo pediculado o libre. También ha sido descrito como modelo de vehículo vascular para prefabricación en cirugía reconstructiva [133] y como vehículo de células madre para regeneración de nervios sensitivos [109].

En nuestro estudio, hemos diseñado el colgajo epigástrico como modelo de colgajo prefabricado que utiliza la prefabricación para aumentar la implantación de células madre. Uno de los potenciales beneficios de la inyección subcutánea de células madre en un colgajo pediculado es la ausencia de límite de tiempo a la hora de inyectar células madre ya que no tenemos la limitación de la circulación extracorpórea. Por ello, si es necesario, se podrían realizar varias inyecciones en diferentes periodos de tiempo si se necesitase aumentar el implante celular.

Evitando el explante del colgajo y la perfusión mediante biorreactor, se pueden destacar varias ventajas de este modelo.

La primera ventaja es la obvia simplificación del modelo experimental debido a la ausencia de biorreactor y a la necesidad de microanastomosis vascular para reconectar el colgajo a la circulación sistémica. Esto queda demostrado con la tasa de supervivencia del 100% de los colgajos. Además, la ausencia de materiales sintéticos como scaffold disminuye problemas de infección, migración, desplazamiento u obstrucción [44]. La segunda ventaja es que evitamos la limitación de tiempo para la inyección de células que supondría la explantación extracorpórea del colgajo, haciendo así más fácil el manejo y posibilitando la realización de más inyecciones para aumentar la implantación de células si fuera necesario.

Efecto de la prefabricación del colgajo en la supervivencia celular.

Comportamiento celular tras inyección subdérmica.

Un colgajo prefabricado es una técnica avanzada para el tratamiento de deformidades post-traumáticas graves, sin embargo la insuficiente vascularización y la subsecuente necrosis permanecen como principales problemas en la aplicación de esta técnica [46]. Las CMMs pueden ser útiles en cualquier procedimiento de prefabricación, donde la neovascularización es indispensable [21].

Nuestro segundo objetivo en el desarrollo de este trabajo era comprobar si la prefabricación del colgajo influye en la supervivencia celular tras la inyección subcutánea.

Una limitación importante del uso clínico de CMMs es la pobre viabilidad dentro de un tejido dañado debido al microambiente hostil y a la apoptosis o anoikis producida por la pérdida de adhesión celular [134]. Un ambiente desfavorable con isquemia, inflamación, stress oxidativo o mecánico contribuye a una mayor pérdida celular. Diferentes estrategias se han llevado a cabo para aumentar la viabilidad de las células trasplantadas: métodos de administración más efectivos, desarrollo de scaffolds naturales o de polímeros sintéticos, preconditionamiento de las CMMs antes de la inyección y la manipulación genética.

Chang et al. [12] encontraron un aumento en la siembra de CMMs cuando eran inyectadas intravascularmente en el colgajo en comparación con subcutáneamente. Sin embargo Wang et al. (65) encuentran mayor número de células cuando son

inyectadas localmente en comparación con la vía sistémica, en un modelo de expansión cutánea y de tejidos blandos. Nuestros datos previos sugieren que la inyección simple subcutánea puede proveer menos efectividad en la siembra celular que cuando la inyección se realiza sobre el colgajo aislado de los tejidos circundantes. Además, como cabría esperar, si más células son inyectadas en el colgajo prefabricado, más implantación celular se puede apreciar [38].

Los efectos clínicos y terapéuticos de las CMMs pueden ser maximizados si elegimos una ruta de administración apropiada. La siembra celular mediante esponja de colágeno parece ser uno de los medios más eficaces [78]. La vía subcutánea, no obstante, incrementa la viabilidad del colgajo y su flujo sanguíneo.

En nuestro trabajo hemos encontrado CMMs en prácticamente la totalidad (87,5%) de los colgajos en donde fueron inyectadas, dando validez a este modelo como vehículo de implantación de células en ingeniería tisular.

Efecto del tiempo en la implantación de las células madre

Como tercer objetivo de este trabajo planteábamos el estudio del efecto del tiempo en la implantación de las células madre. Si bien los resultados obtenidos no son estadísticamente significativos, sí observamos una tendencia constante en los órganos con mayor implantación celular. Tras una disminución en el recuento celular de células GFP+ hacia la primera semana, se produce un repunte en el grupo de observación de dos semanas. Nuestra hipótesis es que en fases iniciales se produce un gran número de muerte celular. Las células supervivientes y por lo tanto más fuertes comenzarían a reproducirse pasado este periodo inicial, por lo que su hallazgo sería mayor en fases posteriores (grupo 2 semanas). La baja viabilidad en fase aguda inflamatoria, a nivel local y sistémico post-cirugía, podría explicar en parte este fenómeno [135]. Son necesarios más estudios (análisis densitométrico, uso de anticuerpos directos anti-GFP) para confirmar esta hipótesis.

Migración tisular

Por último nos interesaba valorar si este efecto del tiempo era extrapolable a la posible identificación de CMMs en órganos a distancia. Sabemos que las CMMs

tienen propiedad migratoria que varía dependiendo de su tejido de origen, siendo las células madre derivadas de pulmón fetal las de mayor capacidad de migración [136]. La migración de las CMMs hacia órganos diana o tejidos dañados es fundamental en el desarrollo de terapias celulares, sin embargo su mecanismo no ha sido completamente dilucidado [137]. La isquemia tisular es un potente estímulo para el reclutamiento de células progenitoras endoteliales presentes en la circulación [119]. Estudios recientes corroboran esta propiedad migratoria y así Freeman et al. [138] muestran que células madre mesenquimales inyectadas son encontradas no sólo en el lugar de administración, en este caso el corazón, si no también en órganos a distancia (intestino, estómago, hígado) y sugieren que la migración se produce vía vascular. Trabajos en distintas áreas como la fibrosis intersticial renal [139] o la enfermedad de Alzheimer [140] muestran migración celular a distancia. Nuestro trabajo aporta evidencia sobre migración a distancia de CMMs en un modelo de ingeniería tisular aplicable a cirugía reconstructiva. Los principales órganos a los que migran las CMMs serían el pulmón (45% de las ratas estudiadas), y los ganglios linfáticos (41,6%). Aunque también encontramos CMMs en hígado, corazón, riñón, intestino, bazo, músculo y tiroides. Su distribución respecto a la variable tiempo es semejante la observada en el colgajo, con una disminución en el grupo de 1 semana y posterior aumento de recuento en el grupo de mayor tiempo de seguimiento.

Una mejor comprensión de la migración de CMMs ofrecerá nuevas perspectivas en la modulación de la expansión celular y/o el desarrollo de protocolos clínicos que mejoren su eficacia después de ser trasplantadas [141].

Limitaciones del estudio

-Se requiere una curva de aprendizaje a la hora de analizar las células al microscopio. Su manejo por un solo observador hace de esto una de sus limitaciones. Se necesita una alta calidad en de las preparaciones de los portas para no dificultar el estudio. Órganos como el bazo o el ganglio linfático, que presentan una altísima densidad celular, dificultan la visualización de células GFP.

Perspectiva de futuro

La cirugía reconstructiva está avanzando y evolucionando hacia la cirugía regenerativa. Las células madre mesenquimales y los factores de crecimiento aparecen como la gran promesa para la regeneración de tejido autólogo. Aunque esta tecnología sea cara, la disminución del número de procedimientos quirúrgicos necesarios y el acortamiento del tiempo de recuperación pueden mejorar la relación coste-efectividad [100].

El desarrollo de métodos para regenerar tejidos humanos y órganos mediante ingeniería tisular, tendrá una gran influencia en muchas especialidades médicas en el futuro más próximo. La esencia de la cirugía plástica es la reconstrucción de tejidos, con un abanico de técnicas que abarcan desde pequeños colgajos cutáneos hasta técnicas microquirúrgicas avanzadas e injertos libres compuestos. Sin embargo estos métodos se basan en la movilización de tejido de una parte del paciente a otra. Para avanzar al siguiente escalón en el desarrollo de la especialidad es necesario abordar el tema de la regeneración [56].

Las terapias regenerativas prometen superar el gold standard actual de los colgajos autólogos mediante la eliminación de la morbilidad asociada a la zona dadora, consiguiendo resultados estéticos y funcionales equivalentes [103].

En los últimos años se han desarrollado nuevas posibilidades en terapias regenerativas gracias a un mejor conocimiento de los mecanismos celulares y moleculares de curación. Muchos de estos métodos han sido trasladados a la práctica clínica en el ámbito de la cirugía reconstructiva y estética. Sin embargo estos avances no deben ocultarnos el riesgo potencial inherente al uso de células madre y factores de crecimiento. Hasta que podamos analizar sus efectos y resultados a largo plazo, su uso debe ser realizado de manera cautelosa [104]. Son necesarios trabajos científicos y ensayos clínicos que avalen el tremendo potencial que tiene la ingeniería tisular [70].

Conclusiones

1. El uso de colgajos cutáneos pediculados prefabricados como vehículo para la inyección subcutánea de células madre, es un modelo fiable en ingeniería tisular. Este modelo se confirma como una opción reproducible y segura para su desarrollo en el campo de la cirugía reconstructiva.
2. La prefabricación del colgajo influye positivamente en la implantación de células madre.
3. Los datos recogidos sugieren que el factor tiempo influye en la implantación y supervivencia de las células. Son necesarios más estudios para confirmar la hipótesis de que tras un periodo inicial en el que se produce muerte celular, las CMMS supervivientes comienzan a crecer y reproducirse.
4. La confirmación de la migración de CCMs a órganos a distancia del órgano o tejido diana debe llevarnos a ampliar nuestro conocimiento sobre las consecuencias que de ello se pudieran derivar.

Bibliografía

1. Crisan M, Yap S, Casteilla L, Chen C-W, Corselli M, Park TS et al. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell*. 2008 Sep 11;3(3):301-313.
2. Majore I, P Moretti, R Hass and C Kasper. Identification of subpopulations in mesenchymal stem cell-like cultures from human umbilical cord. *Cell Commun Signal* 2009;7:6.
3. Schugar RC, SM Chirieleison, KE Wescoe, BT Schmidt, Y Askew, JJ Nance, JM Evron, B Peault and BM Deasy. High harvest yield, high expansion, and phenotype stability of CD146 mesenchymal stromal cells from whole primitive human umbilical cord tissue. *J Biomed Biotechnol* 2009;789526.
4. Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS: The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet* 1970;3:393-403.
5. Kita K, GG Gauglitz, TT Phan, DN Herndon and MG Jeschke. Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from the sub-amniotic human umbilical cord lining membrane. *Stem Cells Dev* 2010;19:491–502.
6. Sarugaser R, D Lickorish, D Baksh, MM Hosseini and JE Davies. Human umbilical cord perivascular (HUCPV) cells: a source of mesenchymal progenitors. *Stem Cells* 2005;23: 220–229.
7. Mitchell KE, Weiss ML, Mitchell BM, Martin P, Davis D, Morales L, Helwig B, Beerenstrauch M, Abou-Easa K, Hildreth T, Troyer D, Medicetty S. Matrix cells from Wharton's jelly form neurons and glia. *Stem Cells*. 2003;21(1):50-60.
8. Nishiyama N, Miyoshi S, Hida N, Uyama T, Okamoto K, Ikegami Y, Miyado K, Segawa K, Terai M, Sakamoto M, Ogawa S, Umezawa A. The significant

cardiomyogenic potential of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in vitro. *Stem Cells*. 2007 Aug;25(8):2017-24.

9. Wu KH, Chan CK, Tsai C, Chang YH, Sieber M, Chiu TH, Ho M, Peng CT, Wu HP, Huang JL. Effective treatment of severe steroid-resistant acute graft-versus-host disease with umbilical cord-derived mesenchymal stem cells. *Transplantation*. 2011 Jun 27;91(12):1412-6.

10. Kannan RY, Salacinski HJ, Sales K, et al. The roles of tissue engineering and vascularisation in the development of micro-vascular networks: a review. *Biomaterials*. 2005;26:1857-1875.

11. Wong V, Rustad KC, Longaker MT, et al. Tissue engineering in plastic surgery: a review. *Plastic Reconstr Surg*. 2010;126:858-868.

12. Chang EI, Bonillas RG, El-ftesi S, et al. Tissue engineering using autologous microcirculatory beds as vascularized bioscaffolds. *FASEB J*. 2009;23: 906-915.

13. Michaels JV, Levine JP, Hazen A, et al. Biologic brachytherapy: ex vivo transduction of microvascular beds for efficient, targeted gene therapy. *Plast Reconstr Surg*. 2006;118:54-64.

14. Pribaz JJ, Fine N, Orgill DP. Flap prefabrication in the head and neck: a ten year experience. *Plast Reconstr Surg*. 1999;103:808-820.

15. Tark KC, Tuchler RE, Shaw WW. Flap prefabrication: effectiveness of different vascular carriers. *Ann Plast Surg*. 1996;37:298-304.

16. Shen TY. Microvascular transplantation of prefabricated free thigh flap (letter). *Plast Reconstr Surg*. 1982;69:568.

17. Shahram Nazerani. Microsurgical Reconstruction of Maxillary Defects. In Mohammad Hosein Kalantar Motamedi (Ed). *A Textbook of Advanced Oral and Maxillofacial Surgery*. InTech, 2003. 501-530

18. Garfein, E. S., Orgill, D. P., & Pribaz, J. J. Clinical applications of tissue engineered constructs. *Clinics in plastic surgery*, 2003;30(4), 485-498.

19. Hoang NT, Hoehnke C, Hien PT, et al. Neovascularization and free micro- surgical transfer of in vitro cartilage-engineered constructs. *Microsurgery*. 2009;29:52-61.
20. Staudenmaier R, Hoang TN, Kleinsasser N, et al. Flap prefabrication and prelamination with tissue-engineered cartilage. *J Reconstr Microsurg*. 2004;20: 555-564.
21. Uysal CA, Ogawa R, Feng L, et al. Effect of mesenchymal stem cells on skin graft to flap prefabrication: an experimental study. *Ann Plast Surg*. 2010;65: 237-244.
22. Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science*. 1993 May 14;260(5110):920-6.
23. Skalak R, Fox C. Tissue engineering: proceedings of a workshop, held at Granlibakken, Lake Tahoe, California, February 26-29, 1988.
24. Sterodimas A, De Faria J, Correa WE, Pitanguy I. Tissue engineering in plastic surgery: an up-to-date review of the current literature. *Ann Plast Surg*. 2009 Jan;62(1):97-103
25. Walgenbach KJ, Voigt M, Riabikhin AW, Andree C, Schaefer DJ, Galla TJ, Björn G. Tissue engineering in plastic reconstructive surgery. *Anat Rec*. 2001 Aug 1;263(4):372-8.
26. Saltzman WM, Olbricht WL. Building drug delivery into tissue engineering. *Nat Rev Drug Discov*. 2002 Mar;1(3):177-86.
27. Zhang S, Uludağ H. Nanoparticulate systems for growth factor delivery. *Pharm Res*. 2009 Jul;26(7):1561-80.
28. Anitua E, Sánchez M, Orive G, Andia I. Delivering growth factors for therapeutics. *Trends Pharmacol Sci*. 2008 Jan;29(1):37-41.
29. Sinha VR, Trehan A. Biodegradable microspheres for protein delivery. *J Control Release*. 2003 Jul 31;90(3):261-80.
30. Zhang X, Godbey WT. Viral vectors for gene delivery in tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev*. 2006 Jul 7;58(4):515-34.

31. Bonadio J. Tissue engineering via local gene delivery. *J Mol Med (Berl)*. 2000;78(6):303-11.
32. Gurtner GC, Callaghan MJ, Longaker MT. Progress and potential for regenerative medicine. *Annu Rev Med*. 2007;58:299-312.
33. Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT. Wound repair and regeneration. *Nature*. 2008 May 15;453(7193):314-21.
34. Aarabi S, Longaker MT, Gurtner GC. Hypertrophic scar formation following burns and trauma: new approaches to treatment. *PLoS Med*. 2007 Sep;4(9):e234.
35. Arufe MC, De la Fuente A, Mateos J, et al. Analysis of the chondrogenic potential and secretome of mesenchymal stem cells derived from human umbilical cord stroma. *Stem Cells Dev*. 2011;20:1199-1212.
36. De la Fuente A, Mateos J, Lesende-Rodríguez I, et al. Proteome analysis during chondrocyte differentiation in a new chondrogenesis model using human umbilical cord stroma mesenchymal stem cells. *Mol Cell Proteomics*. 2012; 11:M111.010496.
37. Arufe, M.C., De la Fuente, A., Fuentes-Boquete, I., De Toro, F.J., Blanco, F.J. Differentiation of synovial CD-105(+) human mesenchymal stem cells into chondrocyte-like cells through spheroid formation. *J. Cell. Biochem*. 2009;108 (1), 145–155.
38. Rodríguez-Lorenzo A, Arufe MC, de la Fuente A, Fernandez F, Blanco F. Influence of flap prefabrication on seeding of subcutaneously injected mesenchymal stem cells in microvascular beds in rats. *Ann Plast Surg*. 2014 Aug;73(2): 234-8
39. Lorenzo AR, Alvarez A, Garcia-Barreiro J, Centeno A, Lopez E, Martelo F. Design and creation of an experimental program of advanced training in reconstructive microsurgery. *Microsurgery*. 2006;26(6):421-8.
40. Martínez M. Un planteamiento práctico de la bioestadística. 1ª ed. España: Newbook; 2000.
41. Hsueh Y.-Y., Wang D.-H., Huang T.-C., Chang Y.-J., Shao W.-C., Tuan T.-L., Hughes

M.W., Wu C.-C. Novel skin chamber for rat ischemic flap studies in regenerative wound repair. *Stem Cell Research and Therapy*. 2016;7(1) (no pagination).

42. Ye Y., Yuan Y., Lu F., Gao J. Possible role of mechanical force in regulating regeneration of the vascularized fat flap inside a tissue engineering chamber. *Medical Hypotheses*. 2015; 85(6):807-809.

43. Li Q., Zan T., Li H., Zhou S., Gu B., Liu K., Xie F., Xie Y. Flap prefabrication and stem cell-assisted tissue expansion: how we acquire a monoblock flap for full face resurfacing. *The Journal of craniofacial surgery*. 2014;25(1):21-25.

44. Ch'ng S., Wong G.L., Clark J.R. Reconstruction of the trachea. *Journal of reconstructive microsurgery*. 2014;30(3):153-162.

45. Simsek S.B., Keles G.C., Baris S., Cetinkaya B.O. Comparison of mesenchymal stem cells and autogenous cortical bone graft in the treatment of class II furcation defects in dogs. *Clinical Oral Investigations*. 2012;(1):251-258.

46. Li Q.-F. Appearance repair and functional reconstruction of severe post-traumatic deformity. *Journal of Shanghai Jiaotong University (Medical Science)*. 2012;32(9):1251-1253.

47. Oseni A., Crowley C., Lowdell M., Birchall M., Butler P.E., Seifalian A.M. Advancing nasal reconstructive surgery: The application of tissue engineering technology. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. 2012;6 (10):757-768.

48. Okuda T., Uysal A.C., Tobita M., Hyakusoku H., Mizuno H. Prefabrication of tissue engineered bone grafts: an experimental study. *Annals of plastic surgery*. 2010;64 (1):98-104.

49. Zan T., Dong J.Y., Li H., Weng R., Yang M., Xie Y., Li Q.F. Comparison of the effect of local administration of endothelial progenitor cells and VEGF on improving neovascularization in flap prefabrication. *Zhonghua zheng xing wai ke za zhi = Zhonghua zhengxing waikē zazhi = Chinese journal of plastic surgery*. 2009;25(6):451-455).

50. Jiang S.J., He X.S., Ni Y.D., Liu M.L., Liu S.H., Zhong X.C. Proliferation of the

mesenchymal stem cells in a delayed fat flap: an experimental study in rabbits. *Zhonghua zheng xing wai ke za zhi = Zhonghua zhengxing waike zazhi = Chinese journal of plastic surgery*. 2009;25(4):287-289.

51. Habal M.B. Stem cells the core of tissue engineering: an advancement in regenerative medicine, from flaps to tissue engineering. *Journal of Craniofacial Surgery*. 2008;19(5):1193-1194.

52. Xie S.T., Chen B., Tao K., Han J.T., Wang H.T. The study on EPC originated from human umbilical cord blood promoting neovascularization in ischemic skin flap. *Zhonghua zheng xing wai ke za zhi = Zhonghua zhengxing waike zazhi = Chinese journal of plastic surgery*. 2007;23(3):206-208.

53. Stern-Straeter J., Riedel F., Bran G., Hormann K., Goessler U.R. Advances in skeletal muscle tissue engineering. *In Vivo*. 2007;21(3):435-444.

54. Yi C.G., Guo S.Z., Zhang L.X., Wu J.H., Zhang X., Hu Q., Zhang X.D., Zhou Q.H. Experiment of augmenting the survival areas of ischemic flap by transplanting endothelial progenitor cells. *Zhonghua zheng xing wai ke za zhi = Zhonghua zhengxing waike zazhi = Chinese journal of plastic surgery*. 2005;21 (6):429-432.

55. Zhao Y., Hu P., Lu Y.L., Gao F., Qiao Q., Qi K.M. Re-growth of induced-osseous tissue encapsulated in muscular fasciae for prefabrication of an osteo-musculo-cutaneous flap. *Zhonghua zheng xing wai ke za zhi = Zhonghua zhengxing waike zazhi = Chinese journal of plastic surgery*. 2004;20 (2):132-135.

56. Kratz G., Huss F. Tissue engineering - Body parts from the petri dish. *Scandinavian Journal of Surgery*. 2003;92(4):241-247.

57. Izmirli HH, Alagoz MS, Gercek H, Eren GG, Yucel E, Subasi C, Isgoren S, Muezzinoglu B, Karaoz E. Use of Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells to Accelerate Neovascularization in Interpolation Flaps. *J Craniofac Surg*. 2016 Jan;27(1):264-71.

58. Kapi E, Bozkurt M, Selcuk CT, Celik MS, Akpolat V, Isik FB, Bozarslan BH, Celik Y. Comparison of Effects of Pulsed Electromagnetic Field Stimulation on Platelet-Rich

Plasma and Bone Marrow Stromal Stem Cell Using Rat Zygomatic Bone Defect Model. *Ann Plast Surg*. 2015 Nov;75(5):565-71.

59. Zhang Q, Hubenak J, Iyyanki T, Alred E, Turza KC, Davis G, Chang EI, Branch-Brooks CD, Beahm EK, Butler CE. Engineering vascularized soft tissue flaps in an animal model using human adipose-derived stem cells and VEGF+PLGA/PEG microspheres on a collagen-chitosan scaffold with a flow-through vascular pedicle. *Biomaterials*. 2015 Dec;73:198-213.

60. Götz C, Warnke PH, Kolk A. Current and future options of regeneration methods and reconstructive surgery of the facial skeleton. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2015 Sep;120(3):315-23.

61. Jeong HS, Lee HK, Tark KC, Lew DH, Koh YW, Kim CH, Seo IS. Effect of endogenous bone marrow derived stem cells induced by AMD-3100 on expanded ischemic flap. *J Korean Med Sci*. 2014 Nov;29 Suppl 3:S237-48.

62. Sun D, Yang Y, Wei Z, Xu Y, Zhang X, Hong B. Engineering of pre-vascularized urethral patch with muscle flaps and hypoxia-activated hUCMSCs improves its therapeutic outcome. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2014;18(3):434-443.

63. Tsao CK, Ko CY, Yang SR, Yang CY, Brey EM, Huang S, Chu IM, Cheng MH. An ectopic approach for engineering a vascularized tracheal substitute. *Biomaterials*. 2014 Jan;35(4):1163-75.

64. Luo X, Liu Y, Zhang Z, Tao R, Liu Y, He A, Yin Z, Li D, Zhang W, Liu W, Cao Y, Zhou G. Long-term functional reconstruction of segmental tracheal defect by pedicled tissue-engineered trachea in rabbits. *Biomaterials*. 2013 Apr;34(13):3336-44.

65. Wang X, Li C, Zheng Y, Xia W, Yu Y, Ma X. Bone marrow mesenchymal stem cells increase skin regeneration efficiency in skin and soft tissue expansion. *Expert Opin Biol Ther*. 2012 Sep;12(9):1129-39.

66. Taylor JA. Bilateral orbitozygomatic reconstruction with tissue-engineered bone. *J Craniofac Surg*. 2010 Sep;21(5):1612-4.

67. Runyan CM, Jones DC, Bove KE, Maercks RA, Simpson DS, Taylor JA. Porcine allograft mandible revitalization using autologous adipose-derived stem cells, bone morphogenetic protein-2, and periosteum. *Plast Reconstr Surg*. 2010 May;125(5):1372-82.
68. Knobloch K, Vogt PM. [The reconstructive sequence in the 21st century. A reconstructive clockwork]. *Chirurg*. 2010 May;81(5):441-6.
69. Costello BJ, Shah G, Kumta P, Sfeir CS. Regenerative medicine for craniomaxillofacial surgery. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am*. 2010 Feb;22(1):33-42.
70. Sterodimas A, de Faria J, Nicaretta B, Pitanguy I. Tissue engineering with adipose-derived stem cells (ADSCs): current and future applications. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2010 Nov;63(11):1886-92.
71. Zan T, Li Q, Dong J, Zheng S, Xie Y, Yu D, Zheng D, Gu B. Transplanted endothelial progenitor cells increase neo-vascularisation of rat pre-fabricated flaps. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2010 Mar;63(3):474-81.
72. Cetrulo CL Jr. Cord-blood mesenchymal stem cells and tissue engineering. *Stem Cell Rev*. 2006;2(2):163-8.
73. Casabona F, Martin I, Muraglia A, Berrino P, Santi P, Cancedda R, Quarto R. Prefabricated engineered bone flaps: an experimental model of tissue reconstruction in plastic surgery. *Plast Reconstr Surg*. 1998 Mar;101(3):577-81.
74. Chehelcheraghi F, Eimani H, Sadraie S.H., Torkaman G., Amini A., Shemshadi H., Magd H.A. Improved viability of random pattern skin flaps with the use of bone marrow mesenchymal derived stem cells and chicken embryo extract. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*. 2015;18(8):764-772.
75. Tang YH, Pennington LA, Scordino JW, Alexander JS, Lian T. Dynamics of early stem cell recruitment in skin flaps subjected to ischemia reperfusion injury. *Pathophysiology*. 2016 Sep;23(3):221-228.

76. Xu Z., Wu L., Sun Y., Guo Y., Qin G., Mu S., Fan R., Wang B., Gao W., Zhang Z. Tanshinone IIA pretreatment protects free flaps against hypoxic injury by upregulating stem cell-related biomarkers in epithelial skin cells. *BMC complementary and alternative medicine*. 14 (no pagination), 2014.
77. Xu Z., Zhang Z., Wu L., Sun Y., Guo Y., Qin G., Mu S., Fan R., Wang B., Gao W. Tanshinone IIA pretreatment renders free flaps against hypoxic injury through activating Wnt signaling and upregulating stem cell-related biomarkers. *International Journal of Molecular Sciences*. 2014;15(10):18117-18130.
78. Jeon Y.R., Cho E.J., Kang J.H., Lew D.H. Optimal administration routes for adipose-derived stem cells therapy in ischaemic flaps. Lee D.W., *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. 2014;8(8):596-603.
79. Yue Y., Zhang P., Liu D., Yang J.F., Nie C., Yang D. Hypoxia preconditioning enhances the viability of ADSCs to increase the survival rate of ischemic skin flaps in rats. *Aesthetic plastic surgery*. 2013;37(1):159-170.
80. Sonmez T.T., Al-Sawaf O., Brandacher G., Kanzler I., Tuchscheerer N., Tohidnezhad M., Kanatas A., Knobe M., Fragoulis A., Tolba R., Mitchell D., Pufe T., Wruck C.J., Holzle F., Liehn E.A. A Novel Laser-Doppler Flowmetry Assisted Murine Model of Acute Hindlimb Ischemia-Reperfusion for Free Flap Research. *PLoS ONE*. 2013;8(6) (no pagination).
81. Leng X., Zhang Q., Zhai X., Chen Z. Local transplant of human umbilical cord matrix stem cells improves skin flap survival in a mouse model. *Tohoku Journal of Experimental Medicine*. 2012;227(3):191-197.
82. Gao W., Qiao X., Ma S., Cui L. Adipose-derived stem cells accelerate neovascularization in ischaemic diabetic skin flap via expression of hypoxia-inducible factor-1alpha. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2011;15(12):2575-2585.
83. Wang J.-C., Xia L., Song X.-B., Wang C.-E., Wei F.-C. Transplantation of hypoxia preconditioned bone marrow mesenchymal stem cells improves survival of ultra-long random skin flap. *Chinese Medical Journal*. 2011;124(16):2507-2511.

84. Reichenberger MA, Heimer S, Schaefer A, Lass U, Gebhard MM, Germann G, Leimer U, Köllensperger E, Mueller W. Adipose derived stem cells protect skin flaps against ischemia-reperfusion injury. *Stem Cell Rev.* 2012 Sep;8(3):854-862.
85. Yang M., Sheng L., Li H., Weng R., Li Q.-F. Improvement of the skin flap survival with the bone marrow-derived mononuclear cells transplantation in a rat model. *Microsurgery.* 2010;30(4):275-281.
86. Lu F., Mizuno H., Uysal C.A., Cai X., Ogawa R., Hyakusoku H. Improved viability of random pattern skin flaps through the use of adipose-derived stem cells. Lu F., Mizuno H., Uysal C.A., Cai X., Ogawa R., Hyakusoku H. *Plastic and Reconstructive Surgery.* 2008;121(1):50-58.
87. Yi C., Xia W., Zheng Y., Zhang L., Shu M., Liang J., Han Y., Guo S. Transplantation of Endothelial Progenitor Cells Transferred by Vascular Endothelial Growth Factor Gene for Vascular Regeneration of Ischemic Flaps. *Journal of Surgical Research.* 2006;135(1):100-106.
88. Simman R., Craft C., McKinney B. Improved survival of ischemic random skin flaps through the use of bone marrow nonhematopoietic stem cells and angiogenic growth factors. *Annals of Plastic Surgery.* 2005;54(5):546-552.
89. Kubota Y., Kishi K., Satoh H., Tanaka T., Nakajima H., Nakajima T. Transplanted endothelial progenitor cells augment the survival areas of rat dorsal flaps. *Cell Transplantation.* 2003;12(6):647-657.
90. Foroglou P, Karathanasis V, Demiri E, Koliakos G, Papadakis M. Role of adipose-derived stromal cells in pedicle skin flap survival in experimental animal models. *World J Stem Cells.* 2016 Mar 26;8(3):101-5.
91. Ataman MG, Uysal CA, Ertas NM, Bayraktar N, Terzi A, Borman H. The effect of adipose stromal vascular fraction on transverse rectus abdominis musculocutaneous flap: an experimental study. *J Plast Surg Hand Surg.* 2016 Oct;50(5):272-80.
92. Han HH, Lim YM, Park SW, Lee SJ, Rhie JW, Lee JH. Improved skin flap survival in

venous ischemia-reperfusion injury with the use of adipose-derived stem cells. *Microsurgery*. 2015 Nov;35(8):645-52.

93. Xu N, Guo S, Wang Y, Sun Q, Wang C. Transplantation of adipose tissue-derived stromal cells promotes the survival of venous-congested skin flaps in rabbit ear. *Cell Biochem Biophys*. 2015 Mar;71(2):557-63.

94. Gong L, Wang C, Li Y, Sun Q, Li G, Wang D. Effects of human adipose-derived stem cells on the viability of rabbit random pattern flaps. *Cytotherapy*. 2014 Apr;16(4):496-507.

95. Hollenbeck ST, Senghaas A, Komatsu I, Zhang Y, Erdmann D, Klitzman B. Tissue engraftment of hypoxic-preconditioned adipose-derived stem cells improves flap viability. *Wound Repair Regen*. 2012 Nov-Dec;20(6):872-8.

96. Reichenberger MA, Mueller W, Schäfer A, Heimer S, Leimer U, Lass U, Germann G, Köllensperger E. Fibrin-embedded adipose derived stem cells enhance skin flap survival. *Stem Cell Rev*. 2012 Sep;8(3):844-53.

97. Zheng Y, Yi C, Xia W, Ding T, Zhou Z, Han Y, Guo S. Mesenchymal stem cells transduced by vascular endothelial growth factor gene for ischemic random skin flaps. *Plast Reconstr Surg*. 2008 Jan;121(1):59-69.

98. Benderitter M, Gourmelon P, Bey E, Chapel A, Clairand I, Prat M, Lataillade JJ. New emerging concepts in the medical management of local radiation injury. *Health Phys*. 2010 Jun;98(6):851-7.

99. Suga H., Eto H., Aoi N., Kato H., Araki J., Doi K., Higashino T., Yoshimura K. Adipose tissue remodeling under ischemia: death of adipocytes and activation of stem/progenitor cells. *Plastic and reconstructive surgery*. 2010;126(6):1911-1923.

100. Pataia E., Arleo S., Somma F., Menichini G., D'antonio A., Alfano C. Use of biotechnologies in cutaneous injuries limb repair European Surgical Research. Conference: 23rd National Congress of the Italian Society of Young Surgeon, SPIGC 2010 Forli Italy. 2010;45 (3-4):228.

101. Rudolph R. Radiation diminishes stem cell function but does not cause

ischemia. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 2009;124(1):343.

102. Yoshida S, Yoshimoto H, Hirano A, Akita S. Wound Healing and Angiogenesis through Combined Use of a Vascularized Tissue Flap and Adipose-Derived Stem Cells in a Rat Hindlimb Irradiated Ischemia Model. *Plast Reconstr Surg*. 2016 May;137(5):1486-1497.

103. Combellack EJ, Jessop ZM, Naderi N, et al. Adipose regeneration and implications for breast reconstruction: update and the future. *Gland Surgery*. 2016;5(2):227-241.

104. Kuhbier JW, Reimers K, Radtke C, Vogt PM. [Regenerative therapy approaches in plastic surgery]. *Chirurg*. 2015 Mar;86(3):214-222.

105. Jo DI, Yang HJ, Kim SH, Kim CK, Park HJ, Choi HG, Shin DH, Uhm KI. Coverage of skin defects without skin grafts using adipose-derived stem cells. *Aesthetic Plast Surg*. 2013 Oct;37(5):1041-1051.

106. Akita S, Yoshimoto H, Akino K, Ohtsuru A, Hayashida K, Hirano A, Suzuki K, Yamashita S. Early experiences with stem cells in treating chronic wounds. *Clin Plast Surg*. 2012 Jul;39(3):281-292.

107. Akita S, Akino K, Hirano A, Ohtsuru A, Yamashita S. Mesenchymal stem cell therapy for cutaneous radiation syndrome. *Health Phys*. 2010 Jun;98(6):858-862.

108. Bey E, Duhamel P, Lataillade JJ, de Revel T, Carsin H, Gourmelon P. Treatment of radiation burns with surgery and cell therapy. A report of two cases. *Bull Acad Natl Med*. 2007 Jun;191(6):971-8.

109. Imaizumi T, Akita S, Akino K, Hirano A. Acceleration of sensory neural regeneration and wound healing with human mesenchymal stem cells in immunodeficient rats. *Stem Cells*. 2007 Nov;25(11):2956-63.

110. Køllef SF, Fischer-Nielsen A, Mathiasen AB, Elberg JJ, Oliveri RS, Glovinski PV, Kastrup J, Kirchhoff M, Rasmussen BS, Talman ML, Thomsen C, Dickmeiss E, Drzewiecki KT. Enrichment of autologous fat grafts with ex-vivo expanded adipose tissue-derived stem cells for graft survival: a randomised placebo-controlled trial.

Lancet. 2013 Sep 28;382(9898):1113-1120.

111. Derby B.M., Dai H., Reichensperger J., Cox L., Harrison C., Cosenza N., Yang M., Bueno R.A., Neumeister M.W. Adipose-derived stem cell to epithelial stem cell transdifferentiation: A mechanism to potentially improve understanding of fat grafting's impact on skin rejuvenation. *Aesthetic Surgery Journal*. 2014;34(1):142-153.

112. Koh K.S., Oh T.S., Kim H., Chung I.W., Lee K.W., Lee H.B., Park E.J., Jung J.S., Shin I.S., Ra J.C., Choi J.W. Clinical application of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in progressive hemifacial atrophy (Parry-Romberg disease) with microfat grafting techniques using 3-dimensional computed tomography and 3-dimensional camera. *Annals of plastic surgery*. 2012;69(3):331-337.

113. Hsu V.M., Stransky C.A., Bucky L.P., Percec I. Fat grafting's past, present, and future: Why adipose tissue is emerging as a critical link to the advancement of regenerative medicine. *Aesthetic Surgery Journal*. 2012;32(7):892-899.

114. Kemaloğlu CA. Nanofat grafting under a split-thickness skin graft for problematic wound management. *SpringerPlus*. 2016;5:138.

115. Zielins ER, Luan A, Brett EA, Longaker MT, Wan DC. Therapeutic applications of human adipose-derived stromal cells for soft tissue reconstruction. *Discov Med*. 2015 Apr;19(105):245-53.

116. Garcia-Vazquez M.D., Morales M.C., Mateos-Mazon J.J., Ayestaran J., Fernandez-Conti P., Gomez-Coloma A., Pijoan J.I., Garcia-Ruiz J.C. Pathology of donor, harvest site and culture medium could determinate mesenchymal stem cell properties. Human Gene Therapy. Conference: European Society for Gene and Cell Therapy and the Spanish Society for Gene and Cell Therapy Collaborative Congress 2013 Madrid Spain. 2013;24(12):A101.

117. Park J.-C., Kim J.-M., Jung I.-H., Kim J.C., Choi S.-H., Cho K.-S., Kim C.-S. Isolation and characterization of human periodontal ligament (PDL) stem cells (PDLSCs) from the inflamed PDL tissue: In vitro and in vivo evaluations. *Journal of Clinical Periodontology*. 2011;38(8):721-731.

118. Soltan M., Smiler D., Soltan C. The inverted periosteal flap: A source of stem cells enhancing bone regeneration. *Implant Dentistry*. 2009;18(5):373-379.
119. Park S., Tepper O.M., Galiano R.D., Capla J.M., Baharestani S., Kleinman M.E., Pelo C.R., Levine J.P., Gurtner G.C. Selective recruitment of endothelial progenitor cells to ischemic tissues with increased neovascularization. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 2004;113(1):284-293.
120. Tepper O.M., Galiano R.D., Kalka C., Gurtner G.C. Endothelial progenitor cells: The promise of vascular stem cells for plastic surgery. *Plastic and Reconstructive Surgery*. 2003;111(2):846-854.
121. Fallucco MA, Carstens MH. Primary reconstruction of alveolar clefts using recombinant human bone morphogenic protein-2: clinical and radiographic outcomes. *J Craniofac Surg*. 2009 Sep;20 Suppl 2:1759-1764.
122. Jerrom R., Jackson D., Patel A. From ancient Indian potters to WWII pilots: The elaborate history of skin grafting. *Journal of the American Academy of Dermatology*. Conference: 73rd Annual Meeting of the American Academy of Dermatology San Francisco, CA United States. 2015;72 (5 SUPPL. 1):AB26.
123. Xiong K., Wang L., Chen X., Can Y., Xiang C., Xue L., Yan Z. Analysis of projects received and funded in fields of emergency and intensive care medicine/trauma/burns/plastic surgery from National Natural Science Foundation of China during 2010-2013. *Chinese Critical Care Medicine*. 2014;26(1):11-16.
124. Saraf S. Role of stem cells in plastic surgery. *Indian J Plast Surg*. 2006; 39:110.
125. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999;284:143-147.
126. Doi K, Kubo T, Hayashi K, et al. Development of cell-hybrid artificial bone: effect of osteogenic differentiation of bone marrow stromal stem cells on bone formation with newly developed interconnected porous calcium hydroxyapatite. *Dent Mater J*. 2007;26:162-169.
127. Zhao M, Zhou J, Li X, et al. Repair of bone defect with vascularized tissue

engineered bone graft seeded with mesenchymal stem cells in rabbits. *Microsurgery*. 2011;31:130-137.

128. Kim S, Kim SS, Lee SH, et al. In vivo bone formation from human embryonic stem cell-derived osteogenic cells in poly (D,L-lactic-co-glycolic acid)/hydroxyapatite composite scaffolds. *Biomaterials*. 2008;29:1043-1053.

129. Hyun JS, Montoro DT, Lo DD, et al. The seed and the soil: optimizing stem cells and their environment for tissue regeneration. *Ann Plast Surg*. 2013;70: 235-239.

130. Rouwkema J, Rivron NC, van Blitterswijk CA. Vascularization in tissue engineering. *Trends Biotechnol*. 2008;26:434-441.

131. Lovett M, Lee K, Edwards A, et al. Vascularization strategies for tissue engineering. *Tissue Eng Part B*. 2009;15:353-370.

132. Tanaka Y, Sung KC, Tsutsumi A, et al. Tissue engineering skin flaps: which vascular carrier, arteriovenous shunt loop or arteriovenous bundle, has more potential for angiogenesis and tissue generation? *Plast Reconstr Surg*. 2003; 112:1636-1644.

133. Nasir S, Aydin MA, Karahan N, et al. Fat tissue as a new vascular carrier for prefabrication in reconstructive surgery: experimental study in rats. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2008;61:799-806.

134. Seahyoung Lee, Eunhyun Choi, Min-Ji Cha, and Ki-Chul Hwang, Cell Adhesion and Long-Term Survival of Transplanted Mesenchymal Stem Cells: A Prerequisite for Cell Therapy. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. 2015, Article ID 632902, 9 pages, 2015.

135. Li L, Chen X, Wang WE, Zeng C. How to Improve the Survival of Transplanted Mesenchymal Stem Cell in Ischemic Heart? *Stem Cells Int*. 2016;2016:9682757.

136. Maijenburg MW, Noort WA, Kleijer M, Kompier CJ, Weijer K, van Buul JD, van der Schoot CE, Voermans C. Cell cycle and tissue of origin contribute to the migratory behaviour of human fetal and adult mesenchymal stromal cells. *Br J Haematol*. 2010 Feb;148(3):428-440.

137. Dittmar T, Entschladen F. Migratory properties of mesenchymal stem cells. *Adv Biochem Eng Biotechnol*. 2013;129:117-36
138. Freeman BT, Kouris NA, Ogle BM. Tracking fusion of human mesenchymal stem cells after transplantation to the heart. *Stem Cells Transl Med*. 2015 Jun;4(6):685-94.
139. Huang D, Yi Z, He X, Mo S, Dang X, Wu X. Distribution of infused umbilical cord mesenchymal stem cells in a rat model of renal interstitial fibrosis. *Ren Fail*. 2013 Sep;35(8):1146-50
140. Park SE, Lee NK, Lee J, Hwang JW, Choi SJ, Hwang H, Hyung B, Chang JW, Na DL. Distribution of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in the Alzheimer's disease transgenic mouse after a single intravenous injection. *Neuroreport*. 2016 Mar 2;27(4):235-41.
141. Cornelissen AS, Maijenburg MW, Nolte MA, Voermans C. Organ-specific migration of mesenchymal stromal cells: Who, when, where and why? *Immunol Lett*. 2015 Dec;168(2):159-693.
142. Gray, Henry, Susan Standring, Harold Ellis, and B. K. B. Berkovitz. 2005. *Gray's anatomy: the anatomical basis of clinical practice*.

Anexo

A continuación se muestran imágenes captadas con microscopio de inunofluorescencia Olympus BX51 en las que se identifican células GFP en los diferentes órganos.

COLGAJO IZQUIERDO



Imagen I. Colgajo izquierdo 40x Rata 1. De izquierda a derecha tinciones DAPI, GFP y su fusión .



Imagen II. Colgajo izquierdo 40x Rata 5. De izquierda a derecha tinciones DAPI, GFP y su fusión

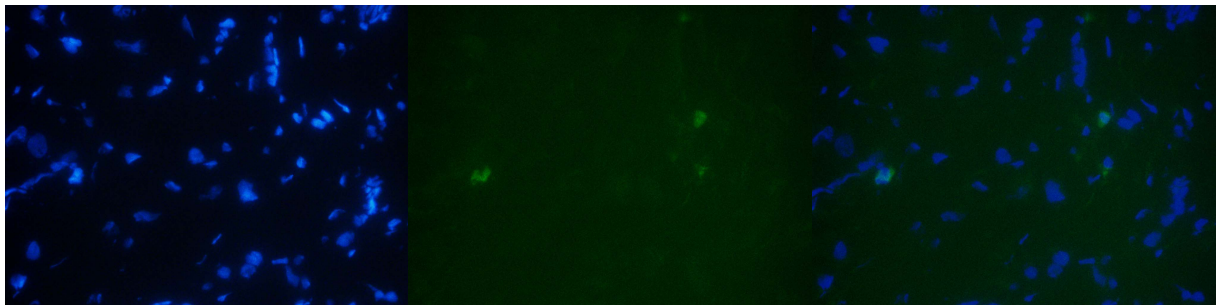


Imagen III. Colgajo izquierdo 40x Rata 9. De izquierda a derecha tinciones DAPI, GFP y su fusión

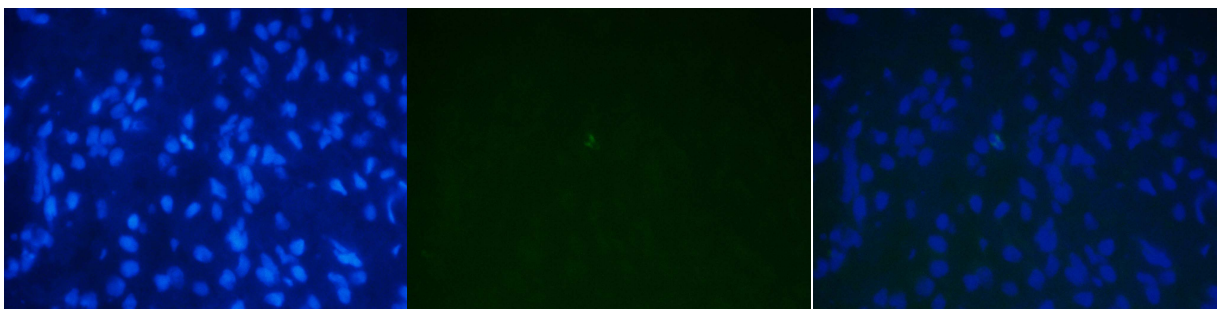


Imagen IV. Colgajo izquierdo 40x Rata 12. De izquierda a derecha tinciones DAPI, GFP y su fusión

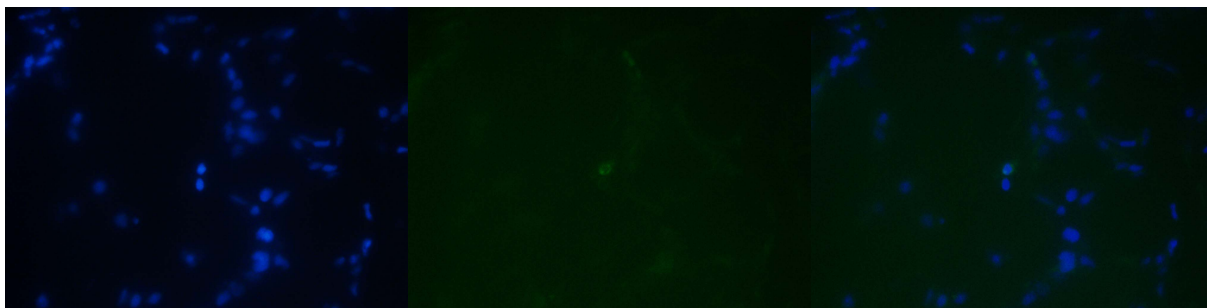


Imagen V. Colgajo izquierdo 40x Rata 13. De izquierda a derecha tinciones DAPI, GFP y su fusión

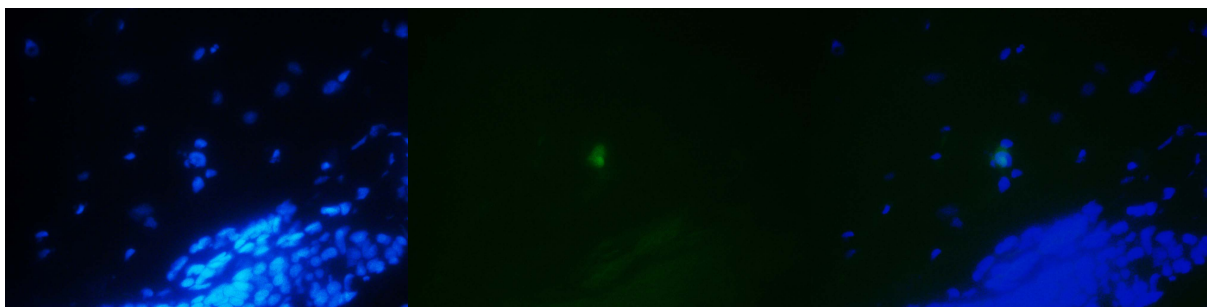


Imagen VI. Colgajo izquierdo 40x Rata 14. De izquierda a derecha tinciones DAPI, GFP y su fusión



Imagen VII. Colgajo izquierdo 40x Rata 15. De izquierda a derecha tinciones DAPI, GFP y su fusión

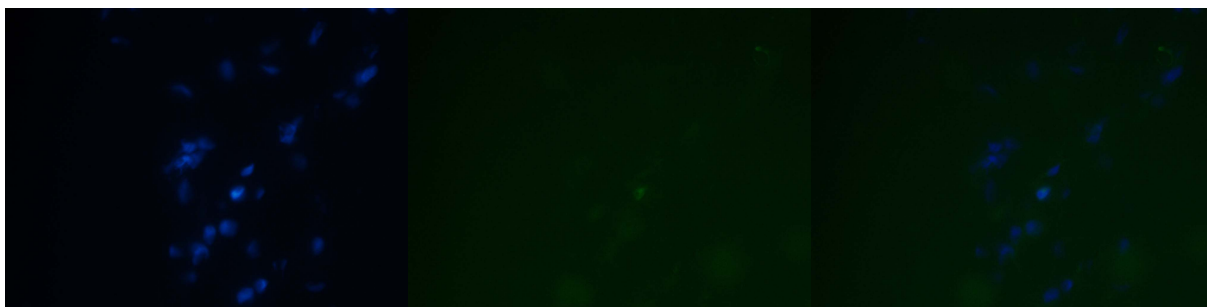


Imagen VIII. Colgajo izquierdo 40x Rata 17. De izquierda a derecha tinciones DAPI, GFP y su fusión

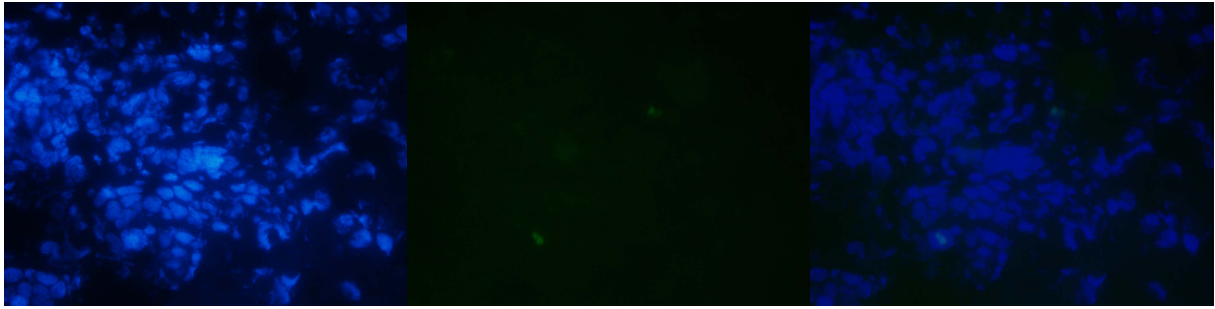


Imagen IX. Colgajo izquierdo 40x Rata 19. De izquierda a derecha tinciones DAPI, GFP y su fusión



Imagen X. Colgajo izquierdo 40x Rata 23. De izquierda a derecha tinciones DAPI, GFP y su fusión

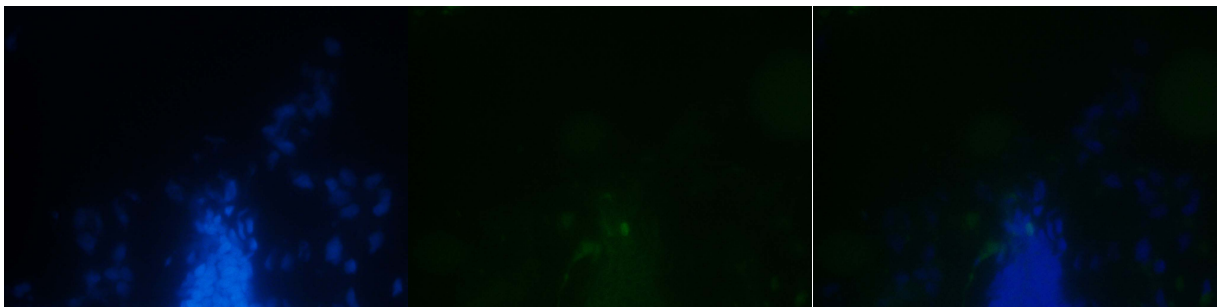


Imagen XI. Colgajo izquierdo 40x Rata 24 De izquierda a derecha tinciones DAPI, GFP y su fusión

COLGAJO DERECHO



Imagen XII. Colgado derecho 40x Rata 13. De izquierda a derecha tinciones DAPI, GFP y su fusión

CORAZÓN

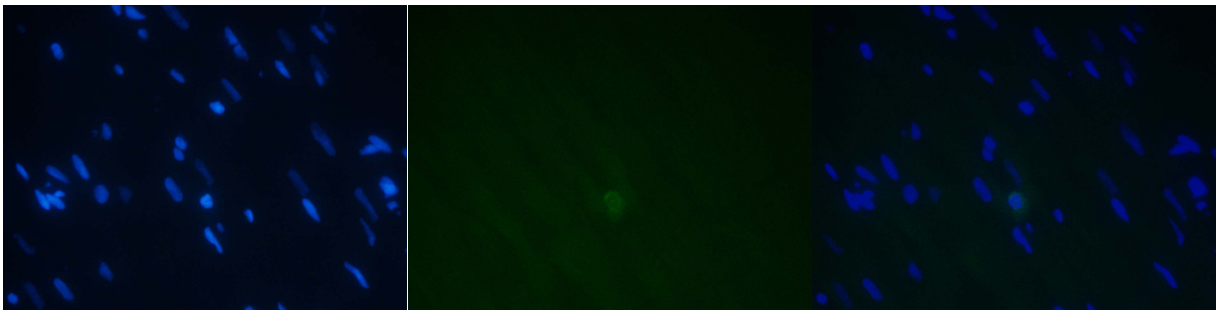


Imagen XIII. Corazón 40x Rata 12. De izquierda a derecha tinciones DAPI, GFP y su fusión



Imagen XIV. Corazón 40x Rata 20. De izquierda a derecha tinciones DAPI, GFP y su fusión

PULMÓN

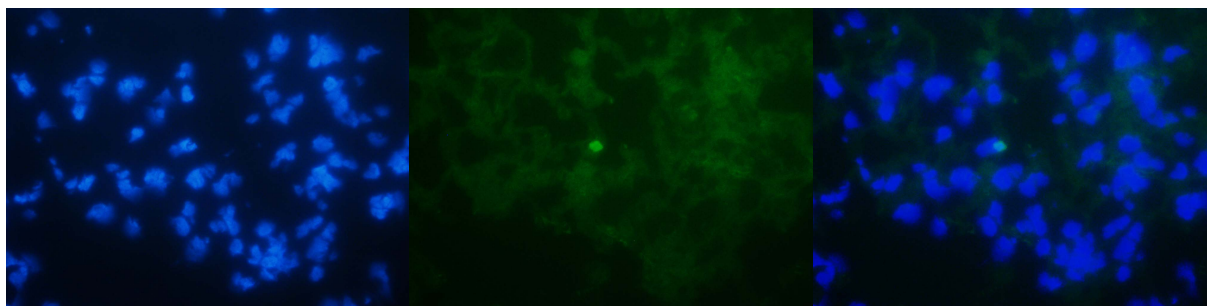


Imagen XV. Pulmón 40x Rata 3. De izquierda a derecha tinciones DAPI, GFP y su fusión

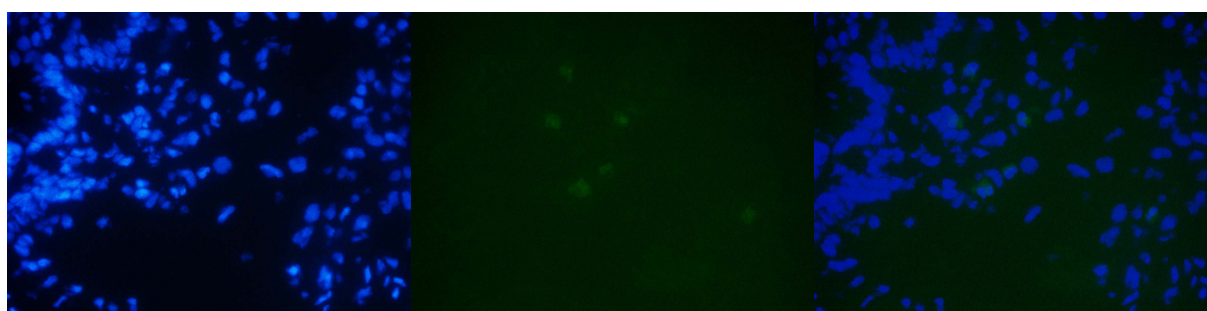


Imagen XVI. Pulmón 40x Rata 8 De izquierda a derecha tinciones DAPI, GFP y su fusión

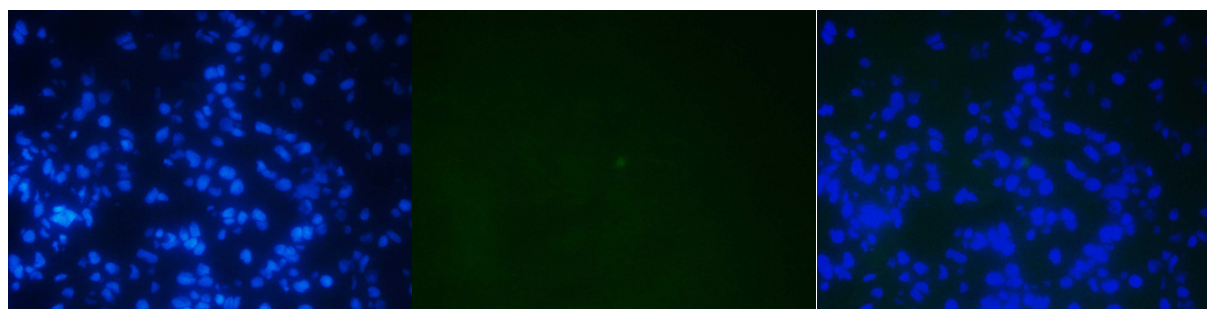


Imagen XVII. Pulmón 40x Rata 13. De izquierda a derecha tinciones DAPI, GFP y su fusión

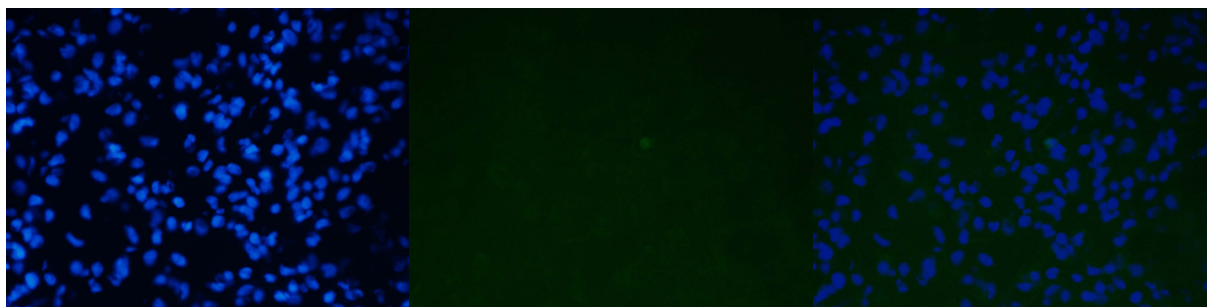


Imagen XVIII. Pulmón 40x Rata 16. De izquierda a derecha tinciones DAPI, GFP y su fusión

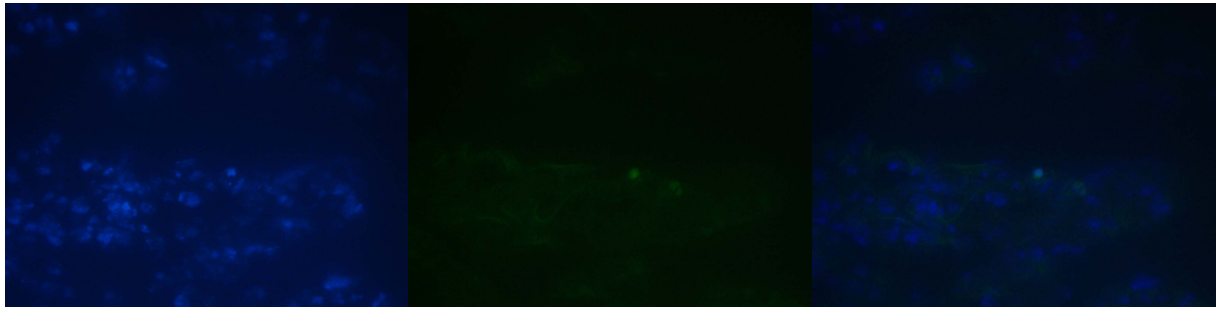


Imagen XIX. Pulmón 40x Rata 19. De izquierda a derecha tinciones DAPI, GFP y su fusión

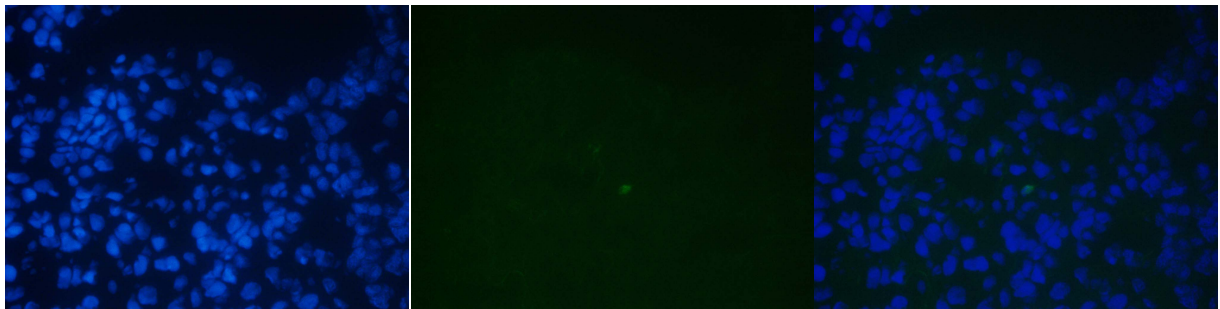


Imagen XX. Pulmón 40x Rata 21. De izquierda a derecha tinciones DAPI, GFP y su fusión



Imagen XXI. Pulmón 40x Rata 23. De izquierda a derecha tinciones DAPI, GFP y su fusión

HÍGADO

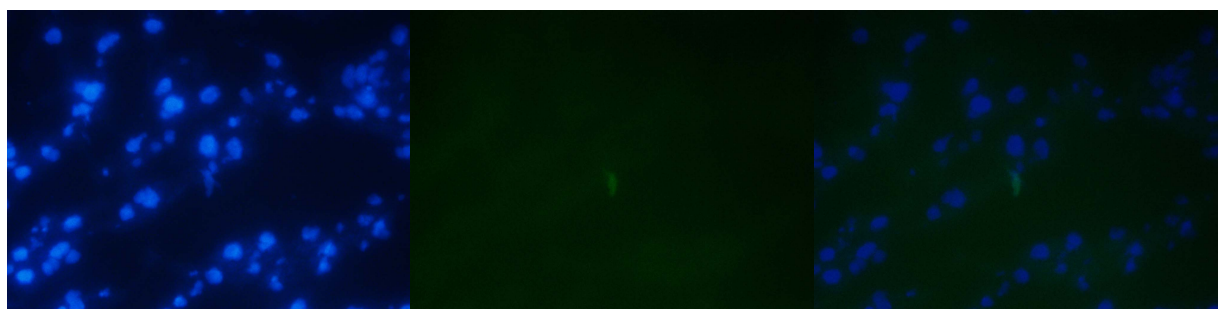


Imagen XXII. Hígado 40x Rata 13. De izquierda a derecha tinciones DAPI, GFP y su fusión

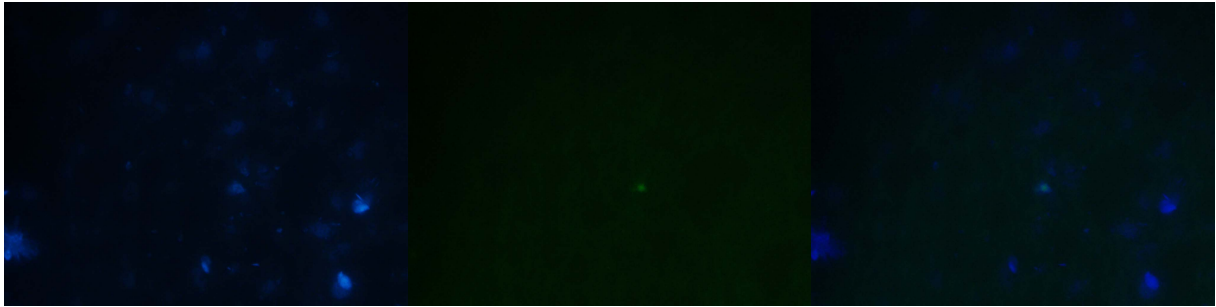


Imagen XXIII. Hígado 40x Rata 17. De izquierda a derecha tinciones DAPI, GFP y su fusión

RIÑÓN

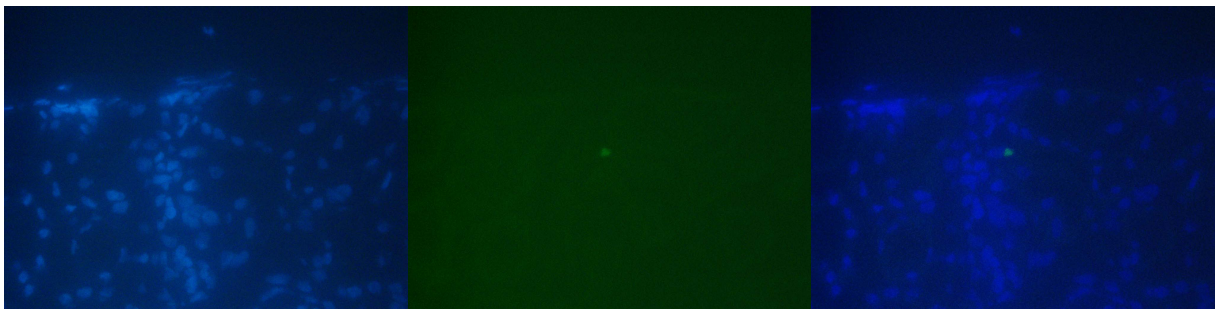


Imagen XXIV. Riñón 40x Rata 7. De izquierda a derecha tinciones DAPI, GFP y su fusión

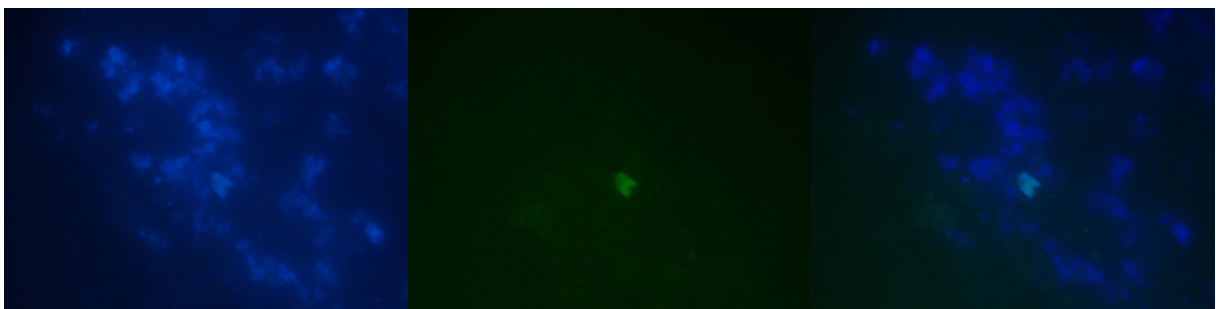


Imagen XXV. Riñón 40x Rata 11. De izquierda a derecha tinciones DAPI, GFP y su fusión

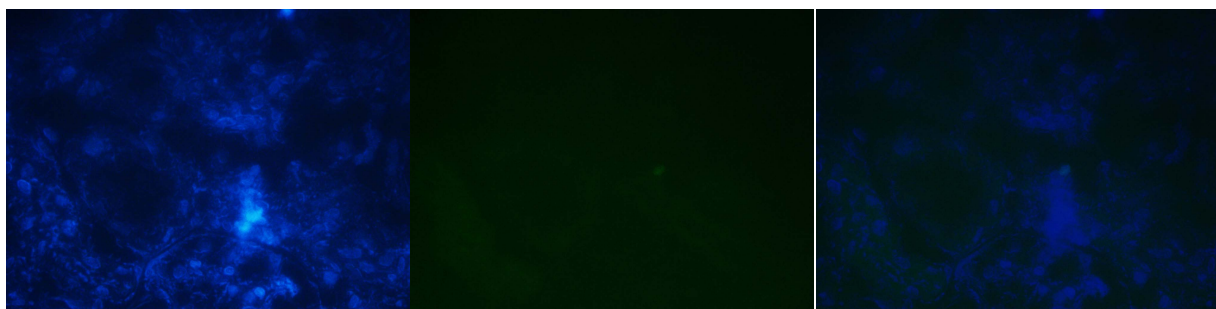


Imagen XXVI. Riñón 40x Rata 15. De izquierda a derecha tinciones DAPI, GFP y su fusión

INTESTINO DELGADO

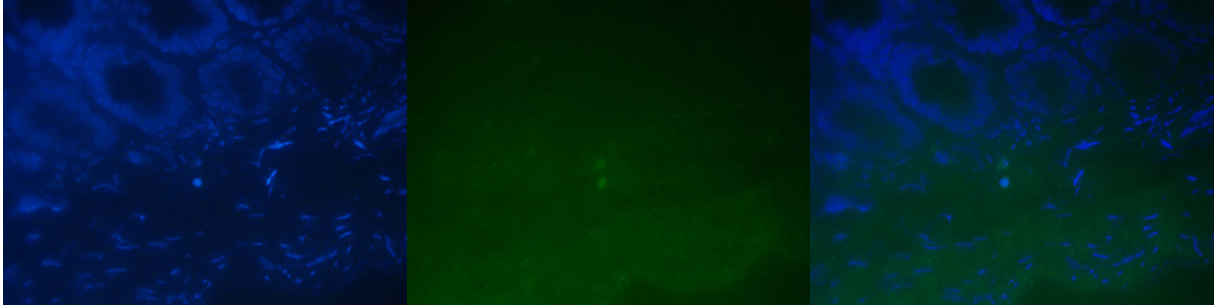


Imagen XXVII. Intestino delgado 40x Rata 14. De izquierda a derecha tinciones DAPI, GFP y su fusión

INTESTINO GRUESO

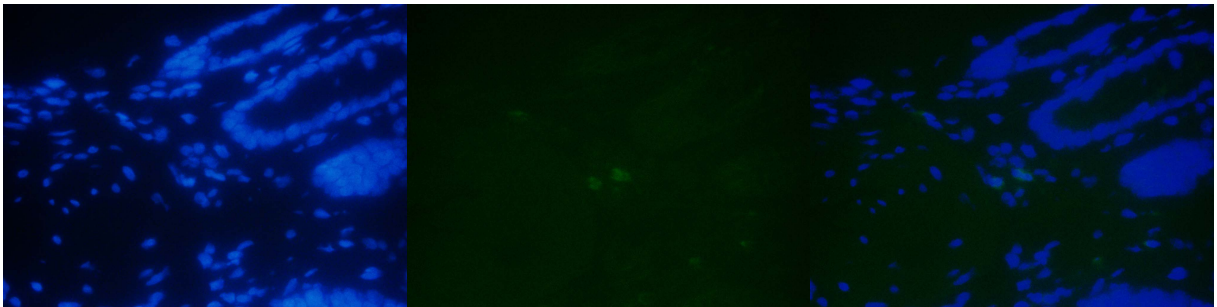


Imagen XXVIII. Intestino grueso 40x Rata 8. De izquierda a derecha tinciones DAPI, GFP y su fusión



Imagen XXIX. Riñón 40x Rata 13. De izquierda a derecha tinciones DAPI, GFP y su fusión

GANGLIO

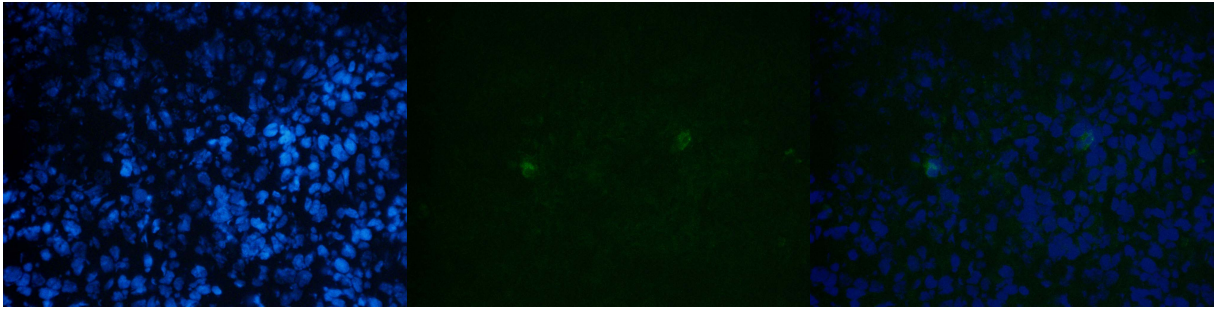


Imagen XXX. Ganglio 40x Rata 9. De izquierda a derecha tinciones DAPI, GFP y su fusión

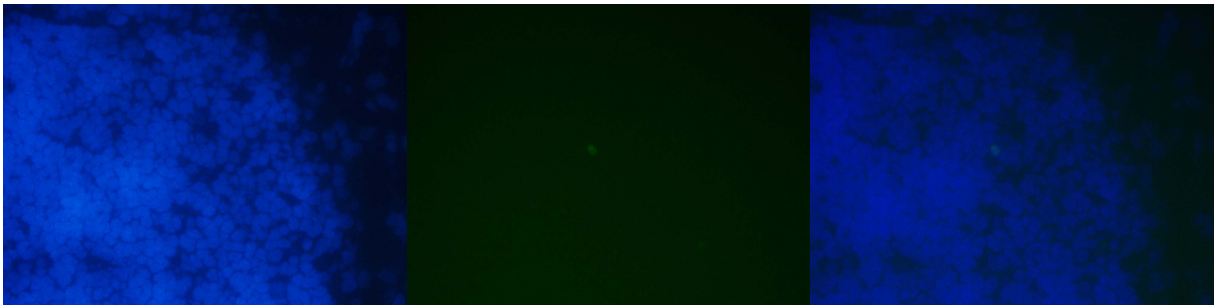


Imagen XXXI. Ganglio 40x Rata 12. De izquierda a derecha tinciones DAPI, GFP y su fusión

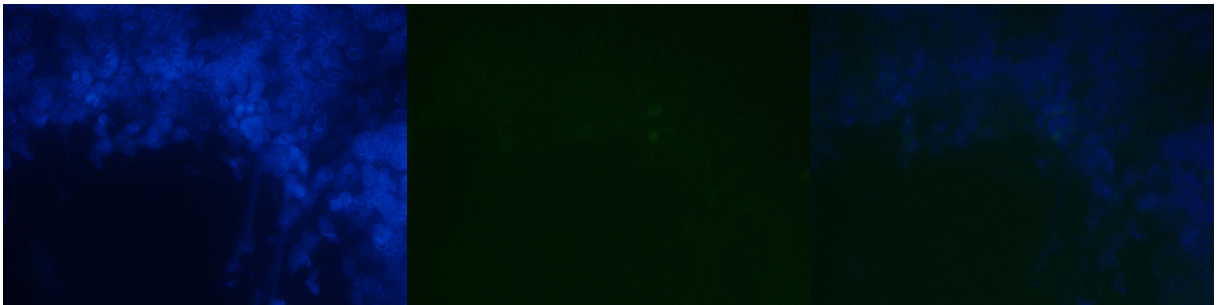


Imagen XXXII. Ganglio 40x Rata 15. De izquierda a derecha tinciones DAPI, GFP y su fusión

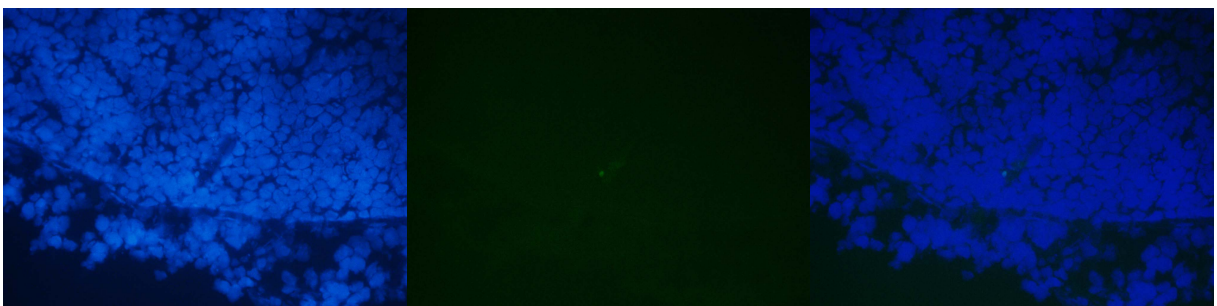


Imagen XXXIII. Ganglio 40x Rata 22. De izquierda a derecha tinciones DAPI, GFP y su fusión

BAZO



Imagen XXXIV. Bazo 40x Rata 18. De izquierda a derecha tinciones DAPI, GFP y su fusión

TIROIDES

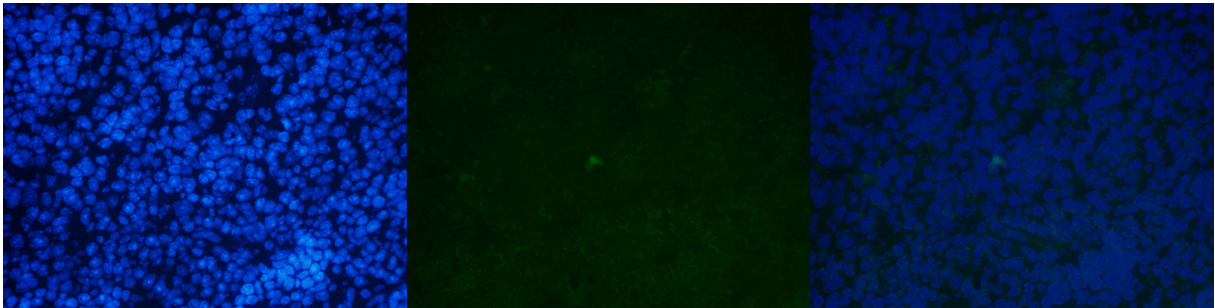


Imagen XXXV. Tiroides 40x Rata 9. De izquierda a derecha tinciones DAPI, GFP y su fusión

MÚSCULO IZQUIERDO

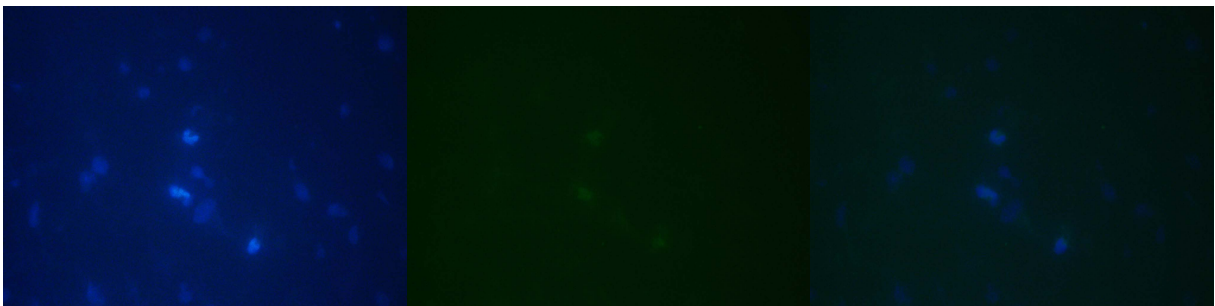


Imagen XXXVI. Músculo izquierdo 40x Rata 15. De izquierda a derecha tinciones DAPI, GFP y su fusión